



Evolution du développement de l'œil chez le poisson cavernicole aveugle *Astyanax mexicanus*

Hélène Hinaux

► To cite this version:

Hélène Hinaux. Evolution du développement de l'œil chez le poisson cavernicole aveugle *Astyanax mexicanus*. Biologie du développement. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T023 . tel-01170623

HAL Id: tel-01170623

<https://theses.hal.science/tel-01170623>

Submitted on 2 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE *Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie*
LABORATOIRE *Neurobiologie & Développement*

Biologie

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 16/06/2014

par

Hélène HINAUX

Evolution du développement de l'œil chez le
poisson cavernicole aveugle *Astyanax mexicanus*

Directrice de thèse :

Sylvie RETAUX

DR CNRS (N&D, Gif sur Yvette)

Composition du jury :

Présidente du jury :

Anne-Hélène MONSORO

Professeur Université Paris-Sud (Institut Curie, Orsay)

Rapporteurs :

Patrick LEMAIRE

DR CNRS (CRBM, Montpellier)

Nicolas DAVID

CR CNRS (IBENS, Paris)

Corinne HOUART

Professeur (King's College, Londres)

Yann GUIGUEN

DR INRA (LPGP, Rennes)

Benjamin PRUD'HOMME

CR CNRS (IBDM, Marseille)

Remerciements

Tout d'abord, merci aux membres du jury qui ont accepté mon invitation. Je m'excuse de leur fournir un tel « pavé », j'espère qu'il ne sera pas trop indigeste...

La thèse est un travail d'équipe, je tiens donc à remercier tous ceux qui ont contribué à rendre ce travail possible et agréable.

Et d'abord, bien sûr, les DECA. Sylvie a été une directrice de thèse enthousiaste, disponible et humaine, je me rends compte de la chance que j'ai eue d'être son étudiante. Elle m'a laissé de l'autonomie, sur les projets, les manips, et les écritures de papiers, tout en étant présente quand il le fallait. Un grand merci à elle. Depuis l'arrivée dans l'équipe de Maryline, la super-ingénieure, tout s'est simplifié, et dans la bonne humeur, c'est un vrai bonheur. Alex, en plus de nous fournir une ambiance musicale variée, a partagé avec plus ou moins de bonheur, mais toujours avec enthousiasme, des nuits blanches d'injection aux laboratoires (avec des poissons qui ne pondent pas toujours...) et des trajets de RER chaotiques jusqu'à Paris (lâcheur... !). Merci aussi à Yannick, notre statisticien officiel et compteur d'artémies, à Yoni (très bon guide de voyage pour les US), à Stéphane qui nous « assure » jusque dans les grottes, et à Magalie, la perle qui chouchoute nos poissons. Merci aussi aux anciens : Karen qui m'a tout appris des manips et qui doit maintenant faire le bonheur de beaucoup d'autres élèves, et Amandine, toujours prête à donner un coup de main sur les tâches communes *Astyanax*, alors que seule la souris l'intéressait... Merci aux stagiaires motivés qui se sont succédés, particulièrement Lise et maintenant Lucie.

Merci aussi à ceux qui ont collaboré à ce travail. Et d'abord merci à Gaëlle pour s'être autant investie dans les projets *Astyanax* : les longues matinées dans l'obscurité des salles de biphotons nous ont sûrement fait sentir cavernicoles... Merci à Didier pour toutes ces discussions sur l'évolution moléculaire et la génétique des populations, et à sa patience de prof pour tout expliquer à des bétotiens. Merci aussi à son étudiant Julien, le premier bioinformaticien de terrain ! Merci à Céline la Toulousaine grâce à qui le monde du séquençage nous a été révélé... Et à Laurent, spécialiste de la transgénèse *Astyanax* au son de System of a down, et expert de l'extinction de la moindre lumière de l'INAF... Merci à Jean-Michel de m'avoir fait découvrir la microscopie électronique, entre deux organisations de fêtes de la science !

Le travail dans le laboratoire N&D n'était pas vraiment un, grâce à l'ambiance incroyable qui y règne. D'abord, grâce à l'esprit collaboratif de tout le monde, il est facile de demander des conseils (merci à Joanne et Zlatko pour les infos sur la PCR, le clonage et la transgénèse, à Pierre pour le DAPI...). Et puis, tous les habitants du « couloir des fous » participent à rendre ce lieu agréable. Je ne les citerai pas tous, mais en vrac : merci au rire inénarrable d'Alessandro qui nous réjouit même à distance, à Aurélie pour les discussions sérieuses, ciné et autres, à Mathieu pour son zen et ses conseils en aquariophilie, à Emilie (que je copie), à Tibi pour ses conseils culturels...

Merci aussi à Franck de m'avoir fait découvrir (et aimer) l'évolution en M1 lors de son UE d'Evo-Dévo, et à Slimane Aït-Si-Ali de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche en L3.

Merci à notre super secrétaire Odile, et aux services communs de l'INAF, en particulier à Nordine pour son aide sur Linux, à Jocelyne de la laverie, toujours arrangeante, et à Alain Pérignon pour avoir déniché des articles introuvables.

Ensuite, merci aux amis pour leur soutien pendant ces 4 années. Merci aux amis thésards qui partageaient ma situation : presque tous les « Kchaniais » (Marine mon demi-cerveau, Marianne qui a écumé les bassins des piscines avec moi (...), Anne-Sophie pour les spectacles de danse, Guillaume pour nous avoir anéantis avec sa soutenance impressionnante en 3 ans top chrono,...), Audrey « Dieu » et ses rats que je retrouverai peut-être à Cambridge, et Gwenaëlle l'autre Giffo-Parisienne.

Merci aux amis non thésards d'avoir réussi à me changer les idées : Julie avec qui on est enfin parties en Islande, et même sans provoquer de catastrophe (!), Julien, capable de dénicher des serpents dans une maison tranquille de la campagne picarde, Pierre-Etienne le prof pour m'avoir accueillie dans son lycée et Lyuba, la littéraire-commerciale franco-suisse !

Merci bien sûr à la famille, qui soutient et supporte depuis longtemps (Abitur, prépa, prépa agreg...) : Maman qui est prête à débarquer de Rennes au moindre gros rhume, accompagnée bien sûr de Papa au volant de sa Laguna (c'est grâce à lui que le mot « béotien » me vient naturellement, ainsi que quelques autres mots désuets !). Et merci au frangin, Baptiste, dont les conseils musicaux ont accompagné une partie de la rédaction de ce manuscrit. Merci aussi à Françoise, quasiment de la famille, pour le soutien local.

Merci enfin à Jean-Stéphane pour ses conseils avant un entretien de post-doc, mais aussi et surtout pour avoir recruté en thèse un jeune homme aux cheveux longs et au nom imprononçable, qui, tout grand qu'il est, ne jure que par les « petits bonhommes »... Merci pour tout à ce jeune homme.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	9
INTRODUCTION	13
A. ETUDE DE L'ORIGINE DES DIFFERENCES MORPHOLOGIQUES	15
I. Forces évolutives	16
a. Sélection positive	16
b. Sélection purificatrice	21
c. Sélection divergente	22
d. Dérive génétique	22
II. L'évo dévo, génétique évolutive du développement : origine développementale des différences morphologiques	25
a. Historique de l'approche évo dévo	25
b. Evolution morphologique due à des mutations dans des séquences codantes	29
c. Evolution morphologique due à des mutations dans des séquences non codantes	32
III. Génomique comparée et évolution moléculaire	37
a. Génomique comparée	37
b. Transcriptomique comparée	42
B. DEVELOPPEMENT DE L'ŒIL	45
I. Généralités sur le développement de l'œil de Vertébré	46
a. Introduction au système visuel des Téléostéens	46
b. Morphogenèse de la rétine de Téléostéen	48
II. Le cristallin, une structure placodale	51
a. Formation de la région panplacodale	51
b. Développement du cristallin à partir de la région panplacodale	53
III. Morphogenèse du cristallin	57
IV. Différenciation du cristallin	60
a. Différenciation de l'épithélium du cristallin	60
b. Différenciation des fibres du cristallin	61
c. Régulation de la différenciation du cristallin	63
1. Prox1	63
2. Les facteurs Maf	64
3. Pitx3	65
4. Foxe3	66
d. Les cristallines	67
1. Les cristallines α	68
2. Les cristallines β	71
3. Les cristallines γ	73
4. Autres cristallines	76
V. Interaction entre composantes de l'œil	77
a. Dépendance du développement du cristallin à d'autres tissus	77
b. Rôle du cristallin sur le développement des autres composants de l'œil	78
C. LES ANIMAUX CAVERNICOLES ET L'ESPECE MODELE ASTYANAX MEXICANUS	81
I. Caractéristiques du milieu cavernicole	82
a. Un milieu extrême	82
b. Et pourtant un milieu occupé	82
II. Les animaux cavernicoles, des animaux dégénérés ?	84
a. Evolution régressive	84
1. Perte de l'œil	85
2. Perte de la pigmentation	89
b. Des changements constructifs	90
III. <i>Astyanax mexicanus</i> , espèce modèle cavernicole	92

a. Histoire évolutive des <i>Astyanax</i>	92
1. Position phylogénétique des <i>Astyanax mexicanus</i>	92
2. Taxonomie et histoire des différentes populations	94
b. Modifications phénotypiques chez les adultes	97
1. Perte de la pigmentation	97
i. Albinisme	97
i. Phénotype « brown »	98
2. Modifications sensorielles	99
i. Ligne latérale et neuromastes	99
ii. Bourgeons du goût.....	101
ii. Olfaction.....	103
3. Modifications comportementales	105
4. Modifications métaboliques	107
c. Perte de l'œil	108
1. Descriptions des défauts de l'œil de l' <i>Astyanax cavernicole</i>	108
2. Origine développementale.....	109
i. Rôle du cristallin	109
ii. Quadrant ventral de la rétine.....	116
iii. Signalisation précoce.....	117
3. Origine génétique	119
4. Origine évolutive	121
RESULTATS	125
A. TABLE DE DEVELOPPEMENT D'ASTYANAX MEXICANUS	127
I. Introduction	127
II. Article publié dans Zebrafish	128
III. Discussion	141
B. DEVELOPPEMENT PRECOCE DES PLACODES CHEZ ASTYANAX MEXICANUS	143
I. Introduction	143
II. Article en préparation	144
III. Discussion	167
C. DIFFERENCIATION DU CRISTALLIN CHEZ ASTYANAX MEXICANUS	171
I. Introduction	171
II. Article soumis à Developmental Neurobiology	172
III. Discussion	207
D. EVOLUTION MOLECULAIRE DU TRANSCRIPTOME CHEZ ASTYANAX MEXICANUS	209
I. Introduction	209
II. Article publié dans Plos One	210
III. Discussion	221
DISCUSSION GENERALE	225
A. ASTYANAX MEXICANUS, UNE ESPECE-MODELE ?	225
B. BASES DEVELOPPEMENTALES DE LA PERTE DE L'ŒIL CHEZ LE POISSON CAVERNICOLE ASTYANAX MEXICANUS	226
C. BASES DE L'ADAPTATION AU MILIEU CAVERNICOLE CHEZ ASTYANAX MEXICANUS	228
RÉFÉRENCES	233
ANNEXES (ARTICLES EN COAUTEUR)	251
A. EVOLUTION DU DEVELOPPEMENT DU QUADRANT VENTRAL DE LA RETINE CHEZ ASTYANAX	251
B. PERTE DE L'AGRESSIVITE CHEZ LES ASTYANAX CF	263
C. SENSIBILITE CHIMIOSENSORIELLE DES ASTYANAX DANS LEUR ENVIRONNEMENT NATUREL	275

D.	REVUE SUR L'EVO-DEVO DU CERVEAU DE VERTEBRE	283
E.	NEUROCHIMIE CHEZ LES ASTYANAX.....	313

Introduction générale

« tous les êtres organisés qui ont vécu sur la terre descendent probablement d'une même forme primordiale dans laquelle la vie a été insufflée à l'origine. » (Darwin, 1859)

La diversité des êtres vivants est fascinante lorsque l'on considère le fait qu'ils dérivent tous d'un ancêtre unique. Au sein des êtres pluricellulaires, les mêmes structures peuvent adopter des formes extrêmement variées, comme la fleur chez les Angiospermes ou le membre antérieur des Mammifères qui peut servir d'aile chez les chauves-souris, de nageoire chez les baleines, ou le plus souvent de membre marcheur. Cette diversité de formes est décrite par les anatomistes depuis plusieurs siècles, mais les mécanismes de l'évolution de cette diversité à partir d'une base commune commencent seulement à être déchiffrés.

L'avènement de l'évo-dévo, l'étude comparée du développement embryonnaire au niveau cellulaire et moléculaire, a permis de nombreuses avancées dans la compréhension des causes développementales de la diversification. Ainsi, la modification de l'expression des gènes de développement d'une structure, que ce soit un changement de position de l'expression (hétérotopie) ou un changement dans le temps (hétérochronie), semble un mécanisme fréquent à l'origine de l'évolution des formes. Plus récemment encore, les avancées dans le séquençage des génomes et la génomique comparée ont permis de comprendre les modifications sous-jacentes de l'ADN, les causes génétiques de ces modifications.

Dans une perspective évolutionniste, la question des causes distales des modifications de formes se pose elle aussi : quelles forces évolutives ont conduit au changement observé ? Le changement permettait-il une meilleure adaptation à l'environnement, auquel cas la sélection naturelle l'a maintenu ? Ou était-il neutre, et s'est-il répandu par hasard, au gré de la dérive génétique ? La question des forces évolutives est particulièrement intrigante dans le cas de l'évolution régressive, c'est-à-dire lorsque l'évolution procède dans le sens de la simplification plutôt que de la complexification, à l'encontre du sens commun.

Au cours de ma thèse, j'ai tenté de répondre à la question des causes développementales, génétiques et évolutives d'une modification particulière : la perte de l'œil chez un poisson cavernicole, *Astyanax mexicanus*. Au sein de cette espèce existent à la fois des populations de poissons de rivière « classiques » et des populations de grottes, pour la plupart aveugles et dépigmentées. La comparaison de ces deux morphotypes par une approche évo-dévo permet de comprendre les mécanismes d'évolution dans les grottes.

L'introduction se concentrera d'abord sur l'origine des différences morphologiques et les moyens de les étudier. Puis, nous décrirons le développement de l'œil et plus particulièrement du cristallin, la partie de l'œil la plus affectée chez *Astyanax mexicanus*. Enfin, nous nous intéresserons aux animaux cavernicoles et à leur intérêt pour étudier les différences phénotypiques, avant de décrire le cas particulier du poisson cavernicole *Astyanax mexicanus*.

Le premier article (publié) s'attache à décrire le développement des morphotypes de rivière et de ceux de la grotte Pachón, dans une table de développement. Il montre que les grandes étapes du développement des deux morphotypes sont synchrones, ce qui permet de comparer rigoureusement les embryons.

Le deuxième article (en préparation) présente la comparaison du développement des placodes du cristallin et de l'épithélium olfactif dans les deux morphotypes, et le rôle des modifications de signalisations précoces dans l'embryon sur ces différences.

Le troisième article (soumis) montre les modifications de différenciation du cristallin chez les morphotypes de grotte, en étudiant les gènes de différenciation que sont les cristallines, du point de vue de leur séquence et de leur expression. La fonction de deux de ces cristallines est également étudiée.

Le quatrième article (publié) s'intéresse à l'évolution moléculaire des *Astyanax* de rivière et de ceux de la grotte Pachón : l'analyse de données transcriptomiques permet de montrer que les gènes du système visuel du poisson cavernicole accumulent des mutations, ce qui suggère un relâchement de la pression de sélection sur ces gènes.

Liste d'abréviations

Bmp :	Bone Morphogenetic Protein
CF :	poisson cavernicole (<i>Astyanax</i>)
dpf :	jours post-fécondation
EST :	fragment de transcrit séquencé (expressed sequence tag)
F0, F1, F2 :	génération des parents, 1 ^e génération de descendants, puis 2 ^e génération
Fgf :	Fibroblast Growth Factor
Hh :	Hedgehog
hpf :	heures post-fécondation
L-DOPA :	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
Ma :	million d'années
Mc1r :	MelanoCortin 1 Receptor
Oca2 :	Oculocutaneous Albinism 2
pb :	paire de bases
QTL :	Quantitative Trait Locus
RPE :	épithélium pigmenté de la rétine
SF :	poisson de surface (<i>Astyanax</i>)
Shh :	Sonic Hedgehog
UV :	ultra-violet
VAB :	comportement d'attraction pour les vibrations (Vibration Attraction Behavior)
Wnt :	Wingless-type mouse mammary tumor virus INTegration site family; famille d'orthologues du gène Wingless de Drosophile

INTRODUCTION

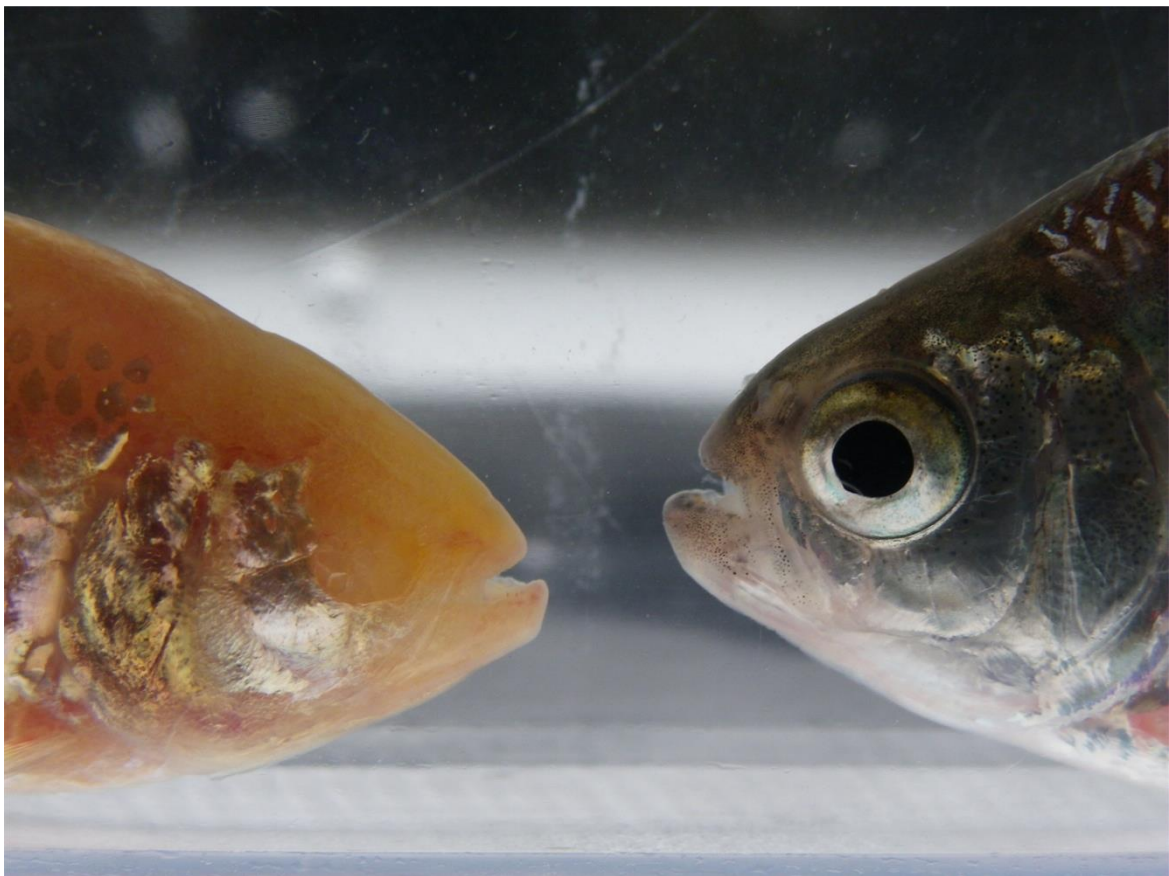


Illustration Photographie d'un Astyanax CF Pachón (à gauche) et d'un SF (à droite) Photographie prise au laboratoire N&D par Sylvie Rétaux et Yannick Elipot.

A. Etude de l'origine des différences morphologiques



Illustration Photographie du crâne de différents oiseaux du groupe des passereaux (de haut en bas, moineau commun, pinson des arbres, chardonneret, bec-croisé des sapins et pinson terrestre à gros bec). Notez en particulier les formes de bec très variables. D'après (Panafieu, 2007).

I. Forces évolutives

L'étude de la diversification morphologique au cours de l'évolution suscite la question, peu classique en biologie, du « pourquoi ? ». La différence observée est-elle adaptative, un avantage sélectif en résulte-t-il ? Et dans ce cas, quel est-il ? Ou cette différence est-elle due au hasard, s'est-elle fixée dans une population par simple dérive génétique ?

Ainsi, en plus de la question des mécanismes développementaux gouvernant la formation de structures anatomiques, comprendre quelles forces évolutives sous-tendent l'acquisition de nouveautés est une autre question essentielle.

En génétique des populations, on compte 6 forces évolutives qui peuvent faire varier la fréquence d'un allèle (**Fig 1**) : la mutation, la migration d'individus, la dérive génétique, la sélection positive (directionnelle), la sélection stabilisatrice (négative) et la sélection divergente (balancée).

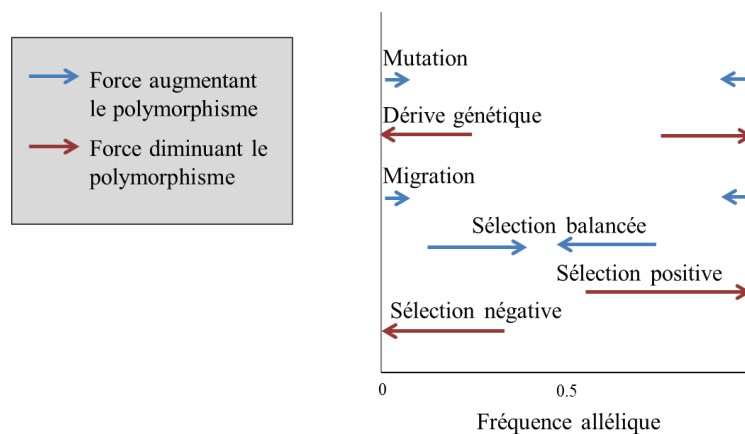


Figure 1 Forces évolutives ayant un effet sur la fréquence d'un allèle dans une population. D'après (Griffiths et al., 2002).

Dans la suite de ce chapitre, nous définirons et discuterons des effets de ces forces évolutives. Nous ne nous intéresserons ni à la mutation (qui se produit au hasard) ni à la migration (qui agit de manière homogène sur tout le génome).

a. Sélection positive

« La moindre supériorité que certains individus, à un âge ou pendant une saison quelconque, peuvent avoir sur ceux avec lesquels ils se trouvent en concurrence, ou toute adaptation plus parfaite aux conditions ambiantes, font, dans le cours du temps, pencher la balance en leur faveur. » (Darwin, 1859)

« La girafe n'acquit pas [...] son long cou en désirant atteindre le feuillage des arbres les plus hauts et en étirant constamment son cou afin d'y arriver, mais parce que toute variété au cou plus long que d'ordinaire apparaissant parmi ses congénères put s'assurer immédiatement un nouvel étage de pâturages sur le même sol que ses compagnons au cou plus court, et fut capable de leur survivre dès la première carence en nourriture. » (Wallace, 1858)

La force évolutive la mieux connue depuis la publication de « l'Origine des espèces » est la sélection positive, vulgarisée par l'expression « la loi du plus fort ». Cette force correspond en effet à la sélection au cours des générations des modifications avantageuses, grâce à la meilleure survie et reproduction des individus qui les portent. Ainsi, un allèle conférant une mutation avantageuse se fixera (atteindra une fréquence de 100%) rapidement dans la population où il apparaît (**Fig 2**).

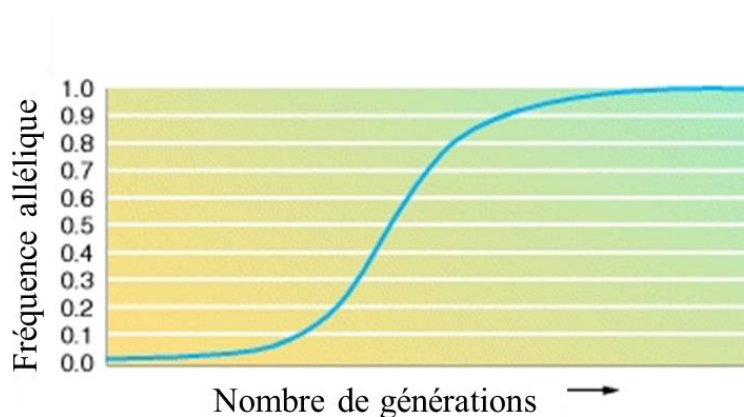


Figure 2 Evolution au cours du temps de la fréquence d'un allèle A avantageux dans une population d'individus aa. D'après (Griffiths, 2000).

Certaines mutations peuvent avoir des effets moins tranchés. Ainsi, la déficience en glucose 6 phosphate déshydrogénase, une des enzymes de la glycolyse qui protège du stress oxydatif, peut sembler *a priori* délétère. En réalité, elle est asymptomatique, sauf dans certaines conditions, infectieuses notamment, où elle peut provoquer des anémies. Et surtout, elle protège de la malaria, peut-être parce que le parasite *Plasmodium falciparum* survit mieux dans des hématies où les conditions redox sont optimales.

Selon des modèles théoriques, cette mutation n'atteint la fixation que si les individus homozygotes et hétérozygotes survivent mieux que les autres, et si donc la résistance à la malaria procure un avantage supérieur à la protection contre le stress oxydatif. Si les hétérozygotes sont les plus avantagés, la fréquence atteinte finalement par la mutation sera 0.5 (Hedrick, 2011). En revanche, si

les homozygotes mutants et les hétérozygotes ont le même avantage sélectif, l'allèle ancestral finit par disparaître car il est désavantageux (Fig 3).

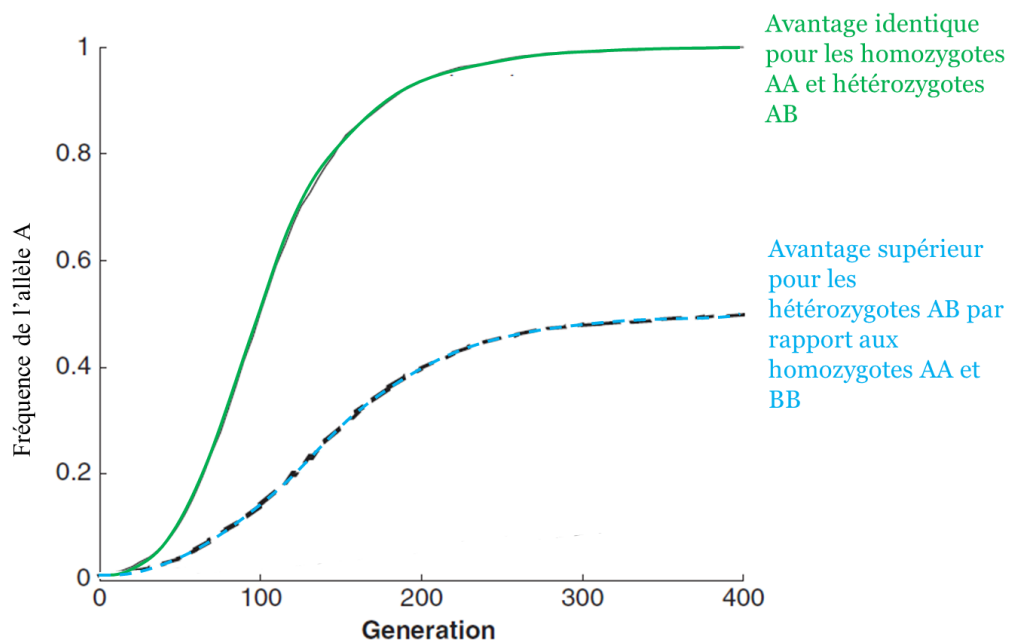


Figure 3 Evolution théorique de la fréquence d'une mutation A avantageuse dans le gène de la glucose 6 phosphate déshydrogénase, mutation qui protège de la malaria. D'après (Hedrick, 2011).

Comment détecter la sélection positive ? La première possibilité est de montrer que la modification étudiée est adaptative, qu'elle permet aux individus la portant de survivre mieux que les autres. Il faut alors imaginer des expériences de compétition entre les individus porteurs de la modification et les autres. Par exemple, des truites domestiques, sélectionnées par les pisciculteurs, ont été mises en compétition avec des truites sauvages, et elles se sont révélées plus rapides pour consommer de la nourriture, même en présence de prédateur. Leur niveau d'activité était en effet plus élevé que celui de la truite sauvage, ce qui pourrait expliquer leur plus grande efficacité à se nourrir (Tymchuk et al., 2007). Ici la nature exacte de la modification avantageuse pour la recherche de nourriture n'est pas connue, mais ce type d'expérience peut être utilisé entre des individus qui ne diffèrent que par un trait.

Dans le cas où la valeur adaptative de la modification est difficile à tester, un indice fort de sélection positive correspond au fait que cette modification s'est produite indépendamment dans plusieurs lignées différentes. En effet, la convergence pour un même phénotype suggère que ce phénotype est avantageux. Ainsi, une expérience d'évolution expérimentale sur des bactéries dans un environnement pauvre en glucose pendant 40000 générations a permis de montrer que 3 gènes étaient systématiquement mutés, dans 11 lignées indépendantes, deux d'entre eux étant liés au métabolisme

des glucides. Cela suggère que dans cet environnement, ces 3 gènes sont sous sélection positive (Barrick et al., 2009).

Il est également possible de détecter des traces de sélection positive dans des séquences nucléotidiques. L'un des moyens les plus simples de détection dans une séquence codante consiste à comparer le taux de substitutions à des sites synonymes (dS), c'est-à-dire dont la mutation ne modifie pas l'acide aminé codé et le taux à des sites non synonymes (dN), c'est-à-dire dont la mutation modifie l'acide aminé codé. En effet, dans le cas où une séquence évolue de façon neutre, les substitutions non synonymes devraient s'accumuler à la même vitesse que les synonymes. Alors, le ratio dN/dS sera aux alentours de 1. Si la mutation du codon observé est avantageuse, les mutations non synonymes auront tendance à s'accumuler davantage et le ratio dN/dS sera au-delà de 1. Si au contraire, l'évolution du codon est très contrainte et qu'il est sous sélection stabilisatrice, seules les substitutions silencieuses pourront s'accumuler et le ratio dN/dS sera très inférieur à 1 (Kryazhimskiy and Plotkin, 2008, **Fig 4**).

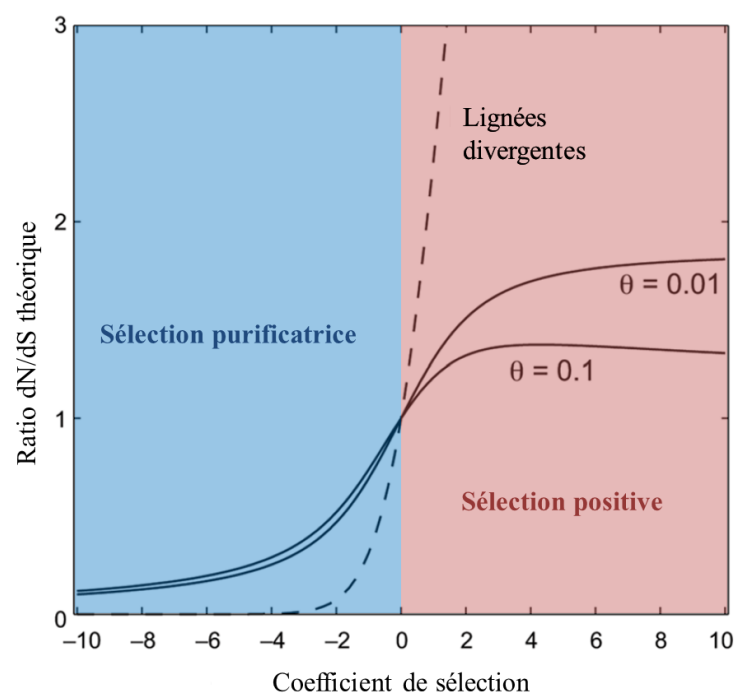


Figure 4 Taux de substitutions non synonymes sur synonymes attendu en fonction du coefficient de sélection sur le codon (θ : taux de mutation). Le coefficient de sélection est une mesure de l'avantage sélectif que confère une mutation. D'après (Kryazhimskiy and Plotkin, 2008).

Ainsi, chez certaines souches du virus de la grippe, la résistance aux adamantanes, une classe de composés antiviraux, est conférée par des mutations dans un codon de la protéine M2 du virus, et ce codon est sous sélection positive avec un ratio dN/dS de 2.721 (Hill et al., 2009).

Les méthodes s'appuyant sur le déséquilibre de liaison permettent de détecter des traces de sélection positive dans n'importe quelle région du génome (pas seulement les parties codantes). Ces méthodes s'appuient sur le fait que lorsqu'une mutation avantageuse est sélectionnée, la région génomique à laquelle elle appartient va elle aussi augmenter en fréquence, juste par l'effet de la liaison génétique : la recombinaison génétique n'est pas suffisamment efficace pour « casser » l'haplotype auquel appartient la mutation avantageuse avant qu'elle ne se fixe. Le résultat est que tous les allèles neutres de cette région chromosomique vont augmenter en fréquence avec la mutation avantageuse, et que le polymorphisme de la région va être fortement réduit. On appelle cet effet le balayage sélectif (**Fig 5**). Les régions très peu polymorphiques dans le génome sont donc interprétées comme des régions qui ont subi une sélection positive récente (Suzuki, 2010).

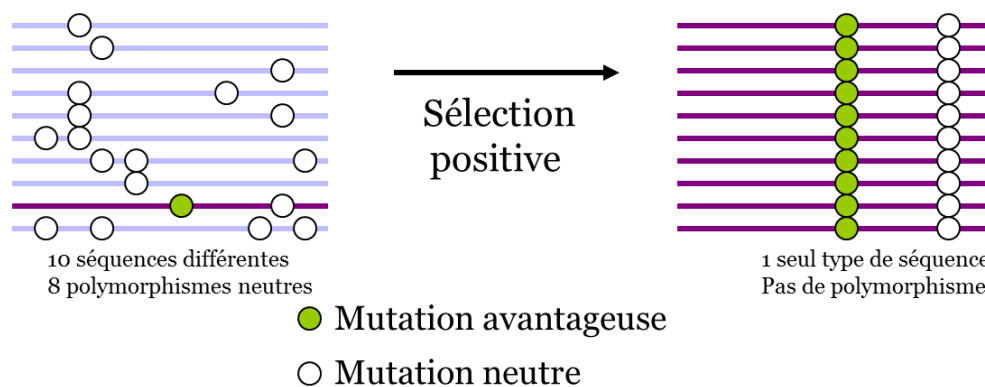


Figure 5 Représentation schématique d'un « balayage sélectif » après sélection positive.

Cette méthode a permis de détecter que la persistance de l'activité lactase en Europe avait été sélectionnée positivement. En effet, l'enzyme lactase, qui permet de digérer le lactose, est normalement exprimée chez le nouveau-né, ce qui lui permet de digérer le lait maternel, puis l'expression s'éteint chez l'adulte. Or, en Europe, près de 80% de la population est capable de digérer le lait à l'âge adulte, ceci grâce à des mutations ponctuelles dans les régions régulatrices du gène de la lactase qui permettent la persistance de son expression chez l'adulte. Si aujourd'hui, cette mutation n'est probablement plus avantageuse, aux débuts de l'agriculture et de l'élevage (vers -9000 ans en Europe), elle a probablement permis à des adultes de survivre en buvant du lait en temps de famine. Or ces mutations du promoteur de la lactase se trouvent sur un haplotype particulièrement long (1Mb), peu polymorphe, suggérant une forte sélection positive il y a 5000-10000 ans (Bersaglieri et al., 2004).

b. Sélection purificatrice

Alors que les modifications avantageuses sont sélectionnées positivement, celles qui sont délétères sont sous sélection négative ou purificatrice. Ainsi, la fréquence d'un allèle délétère décroît rapidement, car les individus qui le portent survivent et se reproduisent moins bien (Fig 6).

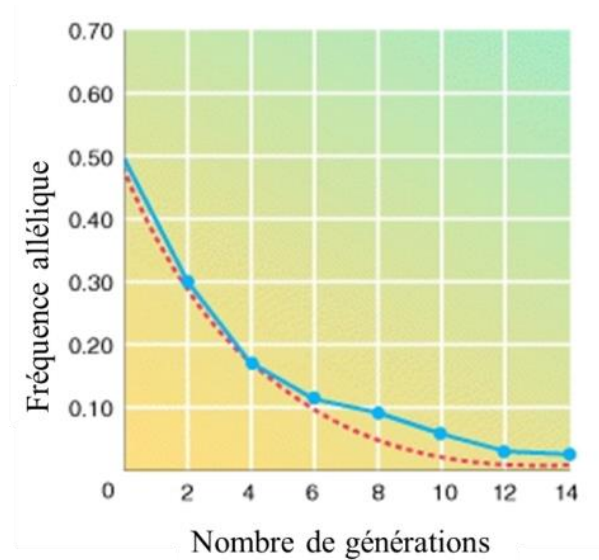


Figure 6 Evolution au cours du temps de la fréquence d'un allèle désavantageux de la déshydrogénase malique dans une population de *Drosophila melanogaster*. Ligne rouge pointillée : courbe théorique. D'après (Griffiths, 2000).

Cette force évolutive limite donc la variabilité. La plupart des séquences codantes sont sous sélection purificatrice, particulièrement les exons (1000 Genomes Project Consortium et al., 2010). On suppose que cela s'explique par le fait que les protéines ont atteint un optimum d'adéquation entre leur structure et leur fonction, si bien que la majorité des mutations qui les affectent sont délétères.

Mais d'autres régions du génome sont sous sélection purificatrice. D'abord, comme dans le cas de la sélection positive, la sélection purificatrice a un effet sur le polymorphisme neutre voisin, et tend à le réduire. Il y a donc une sélection de « fond » au voisinage des gènes, qui élimine le polymorphisme (1000 Genomes Project Consortium et al., 2010). Et puis, des régions du génome non codant sont également fonctionnelles, et donc sous sélection, comme par exemple les enhancers. En effet, la comparaison des génomes de 29 Mammifères euthériens a permis de montrer que 4.2% du génome humain est sous sélection stabilisatrice, une proportion très importante lorsque l'on sait que seul 1.5% du génome code des protéines (Lindblad-Toh et al., 2011). Ici, la méthode pour détecter la sélection a été de comparer les taux de substitution le long du génome : les régions où le taux de substitution est le plus faible correspondraient à des régions où la variabilité a été éliminée par sélection purificatrice.

Le balayage sélectif par la sélection purificatrice a un effet moins drastique que celui lié à la sélection positive : en effet, il conduit à éliminer quelques haplotypes délétères parmi tous ceux existant (**Fig 7**). La sélection positive conduit, elle, à la fixation d'un haplotype avantageux unique.

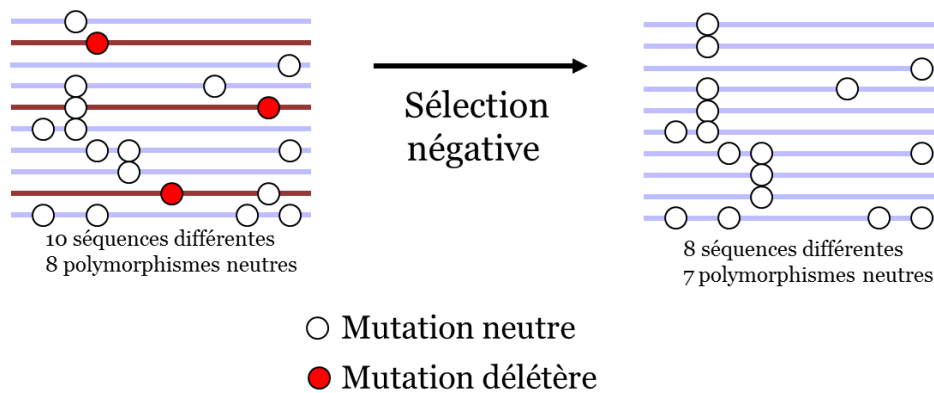


Figure 7 Représentation schématique d'un « balayage sélectif » après sélection purificatrice.

c. Sélection divergente

Pour certains phénotypes, c'est la variabilité qui est un avantage. L'exemple donné classiquement concerne le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), un complexe protéique essentiel dans la reconnaissance du soi. En effet, cette molécule exprimée à la surface de quasiment toutes les cellules de l'organisme présente des fragments de protéines intracellulaires. Lorsque les cellules sont infectées, des portions de protéines virales pourront être présentées et déclencher une réaction immunitaire. Cependant, un allèle de CMH donné ne pourra présenter qu'une partie des peptides, et il est donc avantageux pour chaque individu de porter 2 allèles différents, et pour la population, que ce locus soit le plus polymorphe possible. Les forces évolutives en jeu au locus du CMH-I chez les moineaux ont été étudiées. Une étude de génétique des populations en France a permis de montrer que la variabilité à ce locus était supérieure à celle de microsatellites choisis au hasard, et que la différenciation génétique (mesurée par l'indice de différenciation F_{ST}) entre les populations de moineaux était plus élevée pour ce locus que pour les autres (Loiseau et al., 2009).

d. Dérive génétique

« Des variations qui ne sont ni utiles ni nuisibles à l'espèce, et [...] en conséquence la sélection naturelle ne s'en est pas emparée pour les rendre définitives » (Darwin, 1859)

La plupart des mutations sont neutres : leur fréquence n'est pas soumise à sélection et évolue au hasard. Ainsi, à chaque génération, la fréquence allélique va être modifiée au hasard par rapport à celle de la génération précédente, suite au fait que tous les individus ne se reproduisent pas, ou pas autant. Ainsi, du seul fait du hasard, certaines mutations vont voir leur fréquence augmenter et être finalement fixées, et d'autres vont disparaître (Kimura, 1991, **Fig 8**). La probabilité de fixation d'une mutation neutre correspond à sa fréquence allélique. Ainsi, au moment où une mutation neutre apparaît dans une population d'une taille efficace de N individus, sa probabilité de fixation est de $1/2N$ (Griffiths et al., 2002). On prend en effet en compte la taille efficace d'une population (la taille qu'aurait une population idéale, dans laquelle tous les individus se reproduiraient avec la même efficacité, ayant le même degré de variabilité génétique) plutôt que sa taille réelle, car c'est ce facteur qui influe sur la transmission des allèles d'une génération à la suivante. Pour donner un exemple de la différence entre les deux mesures, la taille efficace de la population humaine est estimée à moins de 10000 individus (Tenesa et al., 2007).

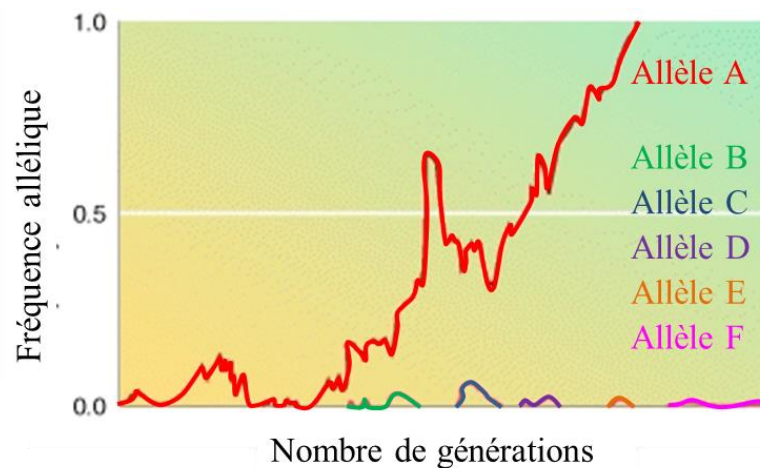


Figure 8 Evolution au cours du temps de la fréquence d'allèles neutres dans une population. D'après (Griffiths, 2000).

Cette force évolutive explique que lorsqu'une population est séparée en deux, les deux groupes isolés vont peu à peu se différencier, même en l'absence de différences environnementales. Si c'est un petit groupe qui se sépare de la population principale, l'effet d'échantillonnage lié à cette séparation aboutit à ce que la première génération de la petite population ait déjà des fréquences alléliques très différentes de la population principale. C'est ce qu'on appelle l'effet de fondation (Griffiths et al., 2002). Ensuite, le fait que la population soit petite augmente la probabilité de fixation des mutations qui sont à l'état polymorphe dans la population initiale.

Les *Travellers* Irlandais sont ainsi un groupe itinérant isolé socialement de la population sédentaire : ils sont significativement différents génétiquement de la population irlandaise sédentaire, au point que certaines études avaient suggéré qu'il pourrait s'agir d'une population Rom plutôt qu'irlandaise. En fait, ils ont évolué par dérive génétique à partir d'un petit nombre d'Irlandais, et sont ensuite restés isolés des sédentaires. L'effet de fondation puis la dérive génétique ont suffi à différencier génétiquement cette population (Relethford and Crawford, 2013).

Dans le cas d'un relâchement de la pression de sélection sur un gène qui est devenu non fonctionnel, ce gène évolue rapidement par dérive génétique. Ainsi, le gène de la cristalline αA , important pour le développement du cristallin, a accumulé des substitutions non synonymes chez le rat-taupe, un animal qui vit dans des galeries souterraines et a des yeux malformés (Hendriks et al., 1987).

II. L'évo dévo, génétique évolutive du développement : origine développementale des différences morphologiques

a. Historique de l'approche *évo dévo*

L'évo dévo est une approche consistant à comparer le développement d'espèces différentes, au point de vue notamment des patrons d'expression des gènes de développement, pour en tirer des conclusions sur l'homologie de certaines structures, ou comprendre leur diversification morphologique.

C'est une discipline assez récente. Elle trouve ses racines dans l'anatomie comparée (pour l'aspect évolutif) et dans la génétique moléculaire du développement. L'embryologie, née dans les années 1800, a montré assez tôt que les espèces se ressemblaient davantage pendant leur développement (pour revue, Hopwood, 2011). Ainsi, Karl Ernst von Baer, en comparant le développement embryonnaire des Vertébrés, s'est aperçu que les embryons se ressemblaient davantage au début du développement (pour revue, Garfield and Wray, 2009 ; **Fig 9**).

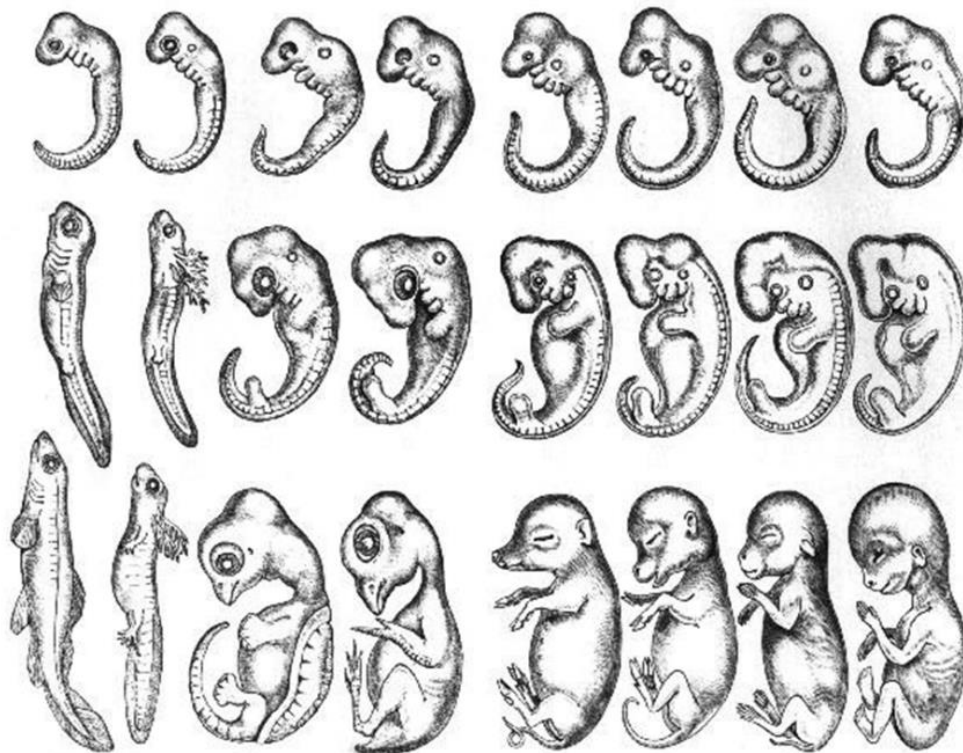


Figure 9 Embryologie de différents Vertébrés selon Karl Ernst von Baer (1892).

Si certains des embryons de la figure présentée sont « faux », l'idée générale, notamment d'un stade « phylotypique » auquel tous les embryons d'un phylum donné se ressemblent, est restée (nous y

reviendrons dans un prochain paragraphe). Pour von Baer cependant, la ressemblance des embryons n'était pas liée à l'héritage d'un ancêtre commun. C'est Ernst Haeckel qui a formulé en 1872 la théorie selon laquelle « l'ontogénie récapitule la phylogénie » : il suggérait ainsi que, de même que les espèces ont évolué en se diversifiant à partir d'un ancêtre commun, les embryons se développent en se différenciant de plus en plus à partir d'un stade précoce commun (pour revue, Olsson et al., 2010). L'évolution des formes aurait suivi celle du développement embryonnaire, et les espèces de Vertébrés auraient évolué à partir d'un ancêtre ressemblant à une gastrula (théorie *Gastrae*) (pour revue, Olsson et al., 2010). Au fur et à mesure de l'évolution, chaque espèce aurait ajouté de nouveaux stades de développement, diversifiant peu à peu le développement par addition terminale de nouveaux stades, et permettant d'expliquer la diversité des morphologies adultes. Pour Haeckel, qui avait une conception gradiste des liens entre les espèces, les Vertébrés auraient tous eu initialement un développement de « poisson », ce qui explique pourquoi ils ont tous des arcs branchiaux, et certains (les plus « évolués ») auraient ajouté de nouvelles étapes de développement. Cette idée a été abandonnée, notamment parce que ce n'est pas forcément aux stades les plus précoces que les embryons se ressemblent le plus, mais surtout car l'idée d'une « échelle des êtres » a été abandonnée.

L'embryologie comparée n'a pas connu de « trou noir » au XX^e siècle (**Fig 10**). Ainsi, Gavin de Beer (1899-1972) qui a commencé sa carrière en embryologie expérimentale, a développé une théorie sur le rôle de l'hétérochronie dans l'évolution, c'est-à-dire des variations évolutives de la durée des différents stades de développement, et particulièrement, sur la rétention de caractères juvéniles chez les adultes (pour revue, Horder, 2006).

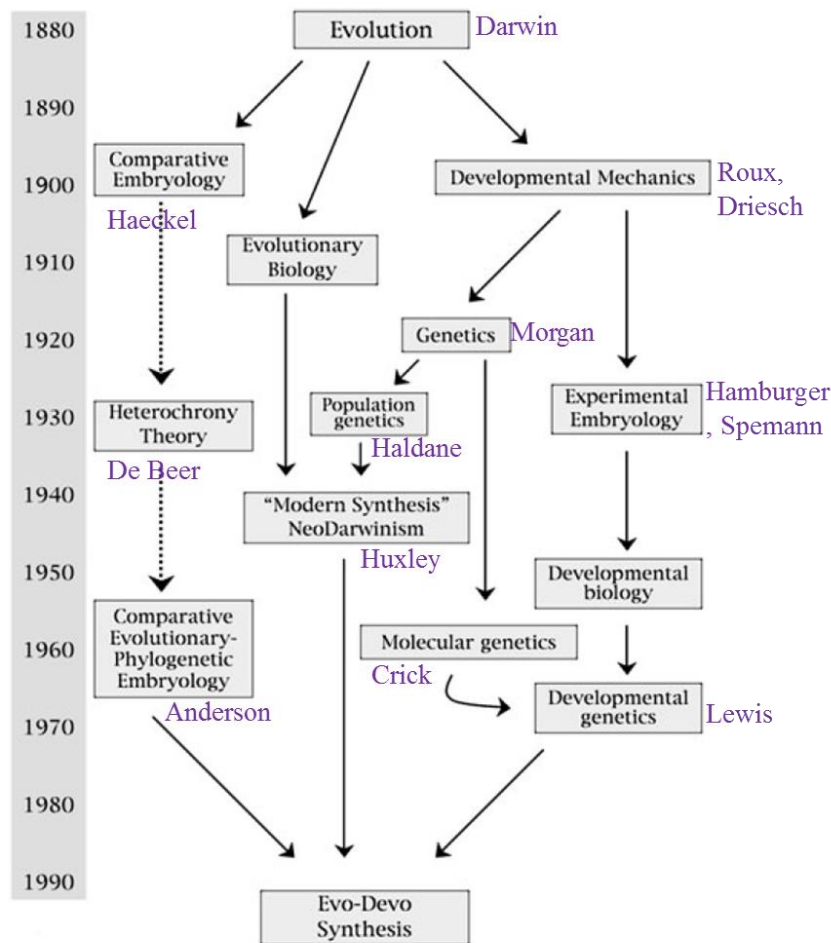


Figure 10 Apports de différentes disciplines à l'évo dévo actuelle. En violet, les noms de chercheurs représentatifs de différentes époques et de différentes disciplines. D'après (Love and Raff, 2003).

En 1973, DT Anderson s'est basé sur la littérature en embryologie pour tenter de déterminer si certains taxons étaient monophylétiques. En particulier, il a comparé les cartes de devenir présumé des embryons au stade blastula de plusieurs groupes considérés comme arthropodes à l'époque (annélides, onychophores, myriapodes, insectes aptérygotes, insectes ptérygotes, crustacés et chélicérates), et en a déduit que les crustacés constituaient un groupe monophylétique, ainsi que les chélicérates (**Fig 11**). Cependant, il n'a pas trouvé assez de ressemblances entre tous les groupes considérés comme arthropodes pour les déclarer monophylétiques (Cather, 1974). Ce type de raisonnement comparatif sur les mécanismes de développement préfigure l'approche évo-dévo. La biologie évolutive et la génétique du développement ne sont donc pas les seules contributrices à l'apparition de l'évo-dévo.

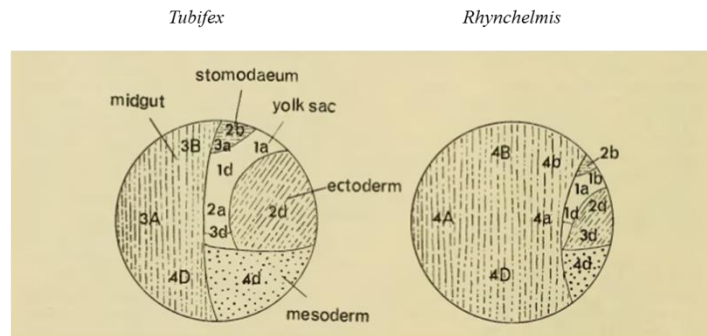
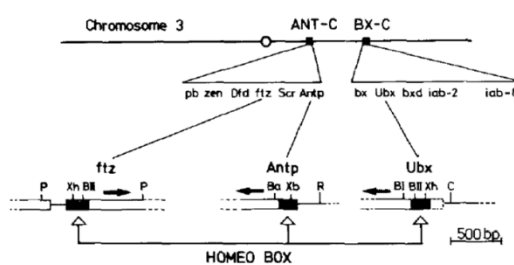


Figure 11 Carte de devenir présomptif des embryons au stade blastula chez deux Annélides oligochètes. D'après (Anderson, 1966).

La découverte majeure qui a permis l'avènement de l'évo dévo moderne est celle des gènes *Hox* (Fig 12). Ces gènes, qui contrôlent la formation et la segmentation de l'axe antéro-postérieur, ont été découverts d'abord chez la *Drosophile* (McGinnis et al., 1984), puis chez les Vertébrés (Duboule and Dollé, 1989).

Complexe *Hox* chez la *Drosophile*



Complexes *Hox* chez la Souris

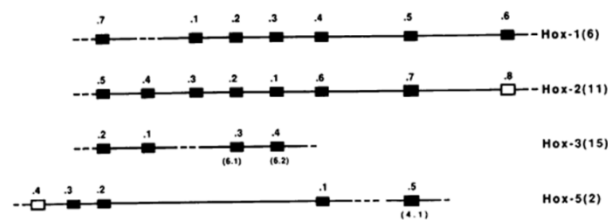


Figure 12 Organisation chromosomique des gènes *Hox* chez la *Drosophile* et chez la Souris. D'après (Duboule and Dollé, 1989; McGinnis et al., 1984).

Au-delà de la conservation de séquence, les gènes *Hox* fonctionnent selon le même mécanisme dans différentes espèces : leur expression le long de l'axe antéro-postérieur est colinéaire par rapport à

leur position chromosomique (Lappin et al., 2006, **Fig 13**). Cette conservation de structure et de fonction à l'échelle des Bilatériens a marqué les esprits à l'époque puisqu'elle était totalement inattendue. Les plans d'organisation des insectes et des Vertébrés sont si différents qu'il paraissait invraisemblable que certains mécanismes développementaux soient conservés à si grande échelle évolutive.

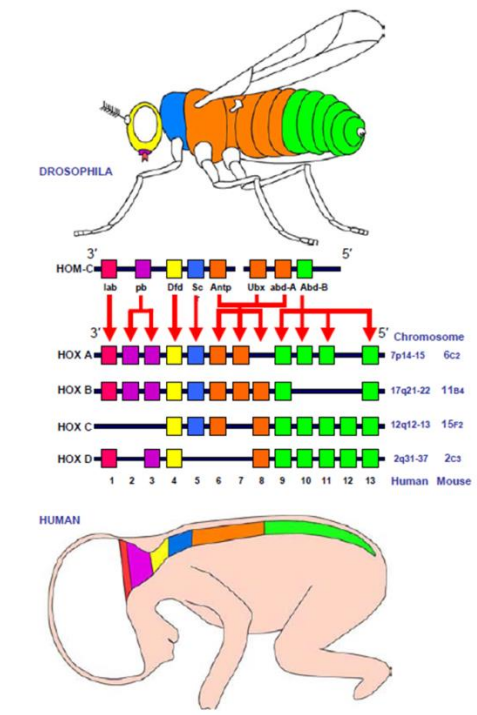


Figure 13 Conservation de l'expression des gènes *Hox* et des propriétés de colinéarité entre la *Drosophile* et la Souris. D'après (Lappin et al., 2006).

C'est cette découverte qui a incité à comparer les mécanismes de développement dans des espèces distantes. Deux grands types d'approches ont été entreprises : soit utiliser l'expression de gènes de développement spécifiques comme indice de l'homologie de certaines structures (souvent à grande distance évolutive), soit comparer finement des espèces (souvent proches) pour comprendre l'origine de leurs différences morphologiques. Nous nous intéresserons uniquement à la 2^e approche, celle qui a été utilisée pour ma thèse.

b. Evolution morphologique due à des mutations dans des séquences codantes

L'évolution morphologique ne passe apparemment pas très couramment par la mutation de séquences codantes. La théorie actuelle est que de nombreux gènes affectant la morphologie ont des rôles pléiotropiques, et qu'une mutation dans leur séquence codante est donc fréquemment délétère

pour l'une des fonctions du gène. Ce sont donc essentiellement des gènes non pléiotropiques qui seraient affectés par les mutations codantes (Carroll, 2008). Ainsi, d'après une base de donnée recensant les mutations causales de différents phénotypes chez les êtres vivants pluricellulaires, 14/20 mutations codantes affectant la morphologie chez des espèces sauvages affectent en fait la pigmentation, un caractère déterminé par des gènes peu pléiotropiques (Stern and Orgogozo, 2008). Ainsi, le gène *Mclr* (melanocortin 1 receptor) est muté chez des représentants de nombreuses espèces (souris, homme, jaguar...), dont la pigmentation est modifiée.

Chez les jaguars, certains individus sont complètement noirs au lieu d'avoir les tâches habituelles, et ce phénotype est lié à une délétion de 5 acides aminés de *Mclr* (Eizirik et al., 2003, **Fig 14**).

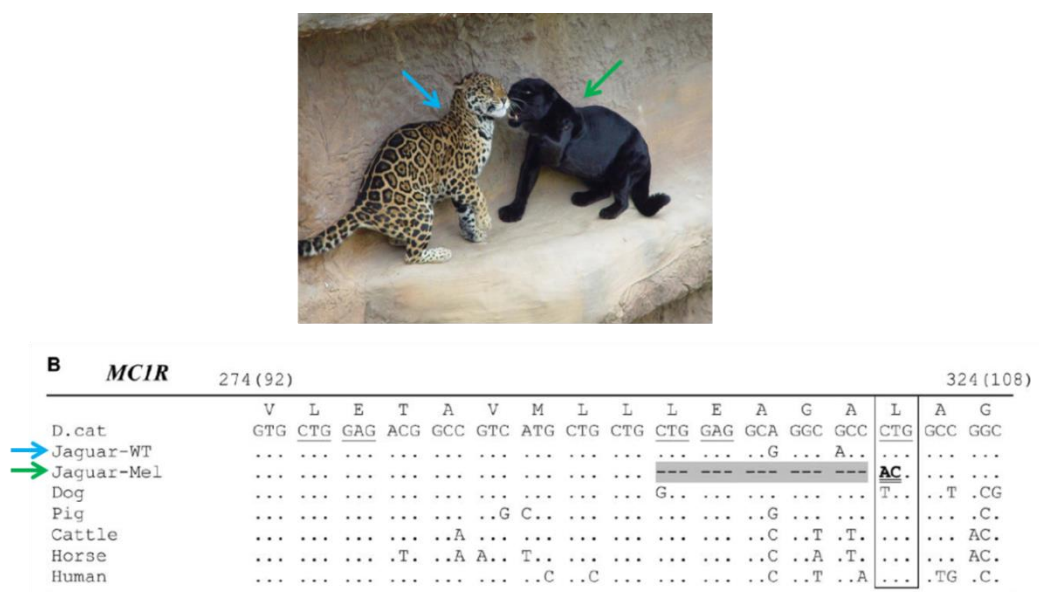


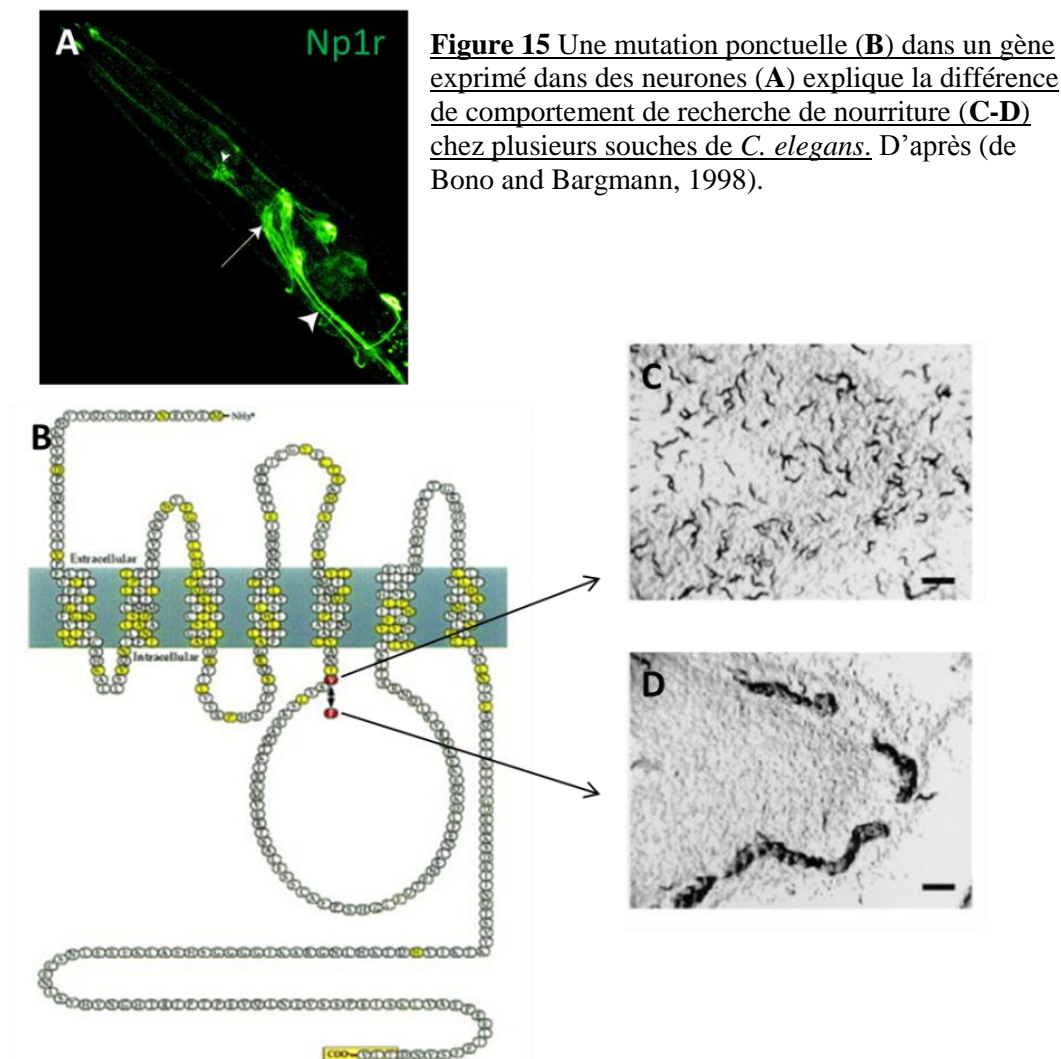
Figure 14 Délétion dans la séquence codante de *Mclr* chez le jaguar mélanique. D'après (Eizirik et al., 2003).

Mclr est en effet le récepteur de l'hormone stimulant les mélanocytes α (α MSH), et est exprimé principalement dans les mélanocytes. Lorsqu'il est activé par son ligand en présence d'UV, la synthèse de la mélanine est activée. Chez le jaguar mélanique, il est probable que le récepteur mutant soit constitutivement actif, car des mutations dans le même domaine du récepteur dans d'autres espèces provoquent son activation constitutive.

Chez les mouches drosophiles, il existe une variabilité naturelle dans le nombre et la répartition des soies. Ainsi, une population marocaine de *D. melanogaster* a des soies ectopiques sur le dos. Ce phénotype est dû à une mutation dans le gène *pad* (poils au dos) qui code pour un facteur de transcription, conduisant à la perte du domaine de liaison à l'ADN. Cette mutation provoque

l'expression ectopique de *scute*, et le développement de soies surnuméraires. C'est donc ici une dérégulation qui est responsable du phénotype, mais il s'agit bien d'une mutation dans une séquence codante (Gibert et al., 2005).

En ce qui concerne l'évolution non morphologique, il existe davantage de cas de mutations codantes. L'un des plus spectaculaires concerne la modification du comportement de recherche de nourriture chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, suite à la mutation d'un unique acide aminé du récepteur de neuropeptide *Npr1*. En effet, dans cette espèce, lorsque la nourriture est abondante, certaines souches la recherchent de manière dispersée (souches dites « solitaires »), alors que d'autres souches s'agrègent (souches « sociales ») (de Bono and Bargmann, 1998, **Fig 15**). D'autres comportements sont modifiés de manière corrélée : les individus des souches sociales se déplacent plus vite que les solitaires. Les souches solitaires auraient en fait perdu la capacité de percevoir les signaux d'agrégation des autres individus. *Npr1* est exprimé dans des neurones de la tête, de la corde nerveuse ventrale et dans le ganglion préanal. Le polymorphisme observé dans le récepteur *npr1* doit modifier l'activité des neurones en réponse aux signaux d'agrégation.



c. Evolution morphologique due à des mutations dans des séquences non codantes

L'un des exemples les plus célèbres de diversification morphologique est celui des pinsons de Darwin. Ces pinsons du genre *Geospiza*, vivant aux Galapagos, ont selon les espèces des becs de forme variée, liée à leur régime alimentaire. La forme du bec dépend de caractères craniofaciaux déterminés génétiquement. Il a été montré que l'expression de *Bmp4* dans le mésenchyme de la « proéminence » du bec était plus importante et plus précoce dans les espèces à bec large, épais et relativement court. De plus, la surexpression de *Bmp4* dans le mésenchyme fronto-nasal du poulet conduit à la formation d'un bec plus large et épais chez le poulet, apparemment *via* une augmentation de la chondrogenèse (Abzhanov et al., 2004, **Fig 16**).

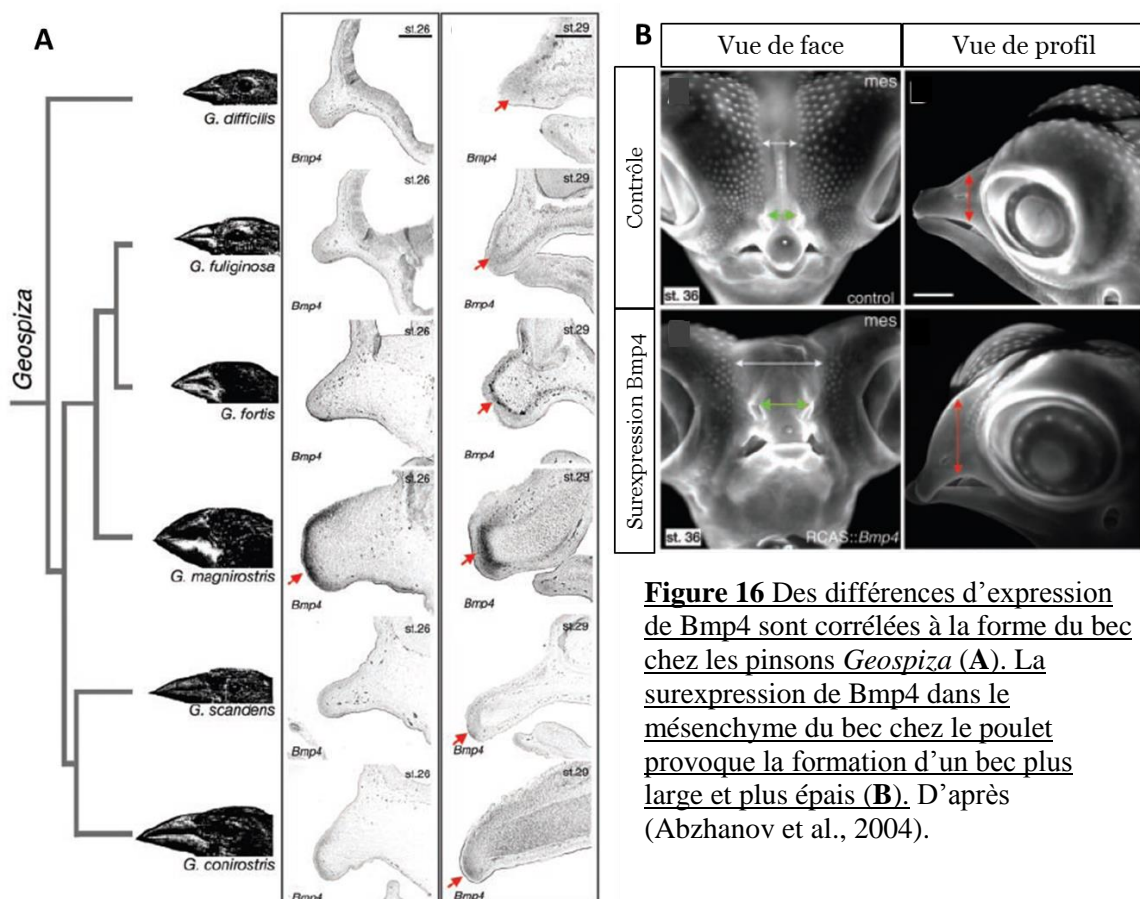


Figure 16 Des différences d'expression de *Bmp4* sont corrélées à la forme du bec chez les pinsons *Geospiza* (A). La surexpression de *Bmp4* dans le mésenchyme du bec chez le poulet provoque la formation d'un bec plus large et plus épais (B). D'après (Abzhanov et al., 2004).

Il s'agit donc ici d'une évolution de la régulation de l'expression de *Bmp4*. Les bases génétiques ne sont pas connues, l'hypothèse la plus vraisemblable est que les séquences régulatrices de *Bmp4* ont évolué.

Un autre exemple dans lequel l'évolution de la *cis* régulation est l'hypothèse la plus probable est celui des cichlidés du lac Malawi, et la diversification de leurs cerveaux. En effet, dans ce lac, des centaines d'espèces de cichlidés sont présentes, par suite d'une radiation adaptative. Ces espèces se

sont spécialisées sur des environnements et des habitudes alimentaires différentes (Salzburger and Meyer, 2004), et leurs cerveaux se sont adaptés en conséquence. Les habitants des parties rocheuses du lac, dans des environnements complexes, ont un télencéphale plus grand et un thalamus plus petit que les habitants des parties sableuses, dont l'environnement est plus homogène. Une étude récente a montré que les tailles relatives du thalamus et du télencéphale sont influencées par un signal Wnt1 exprimé à la frontière cerveau médian / cerveau postérieur (MHB), et un signal antagoniste médié par Six3 exprimé à la ride neurale antérieure (ANR). Ces deux signaux opposés déterminent la position de la *zona limitans intrathalamica* (zli), qui exprime Shh, ce qui définit la limite entre le télencéphale et le diencéphale (Sylvester et al., 2010, **Fig 17**).

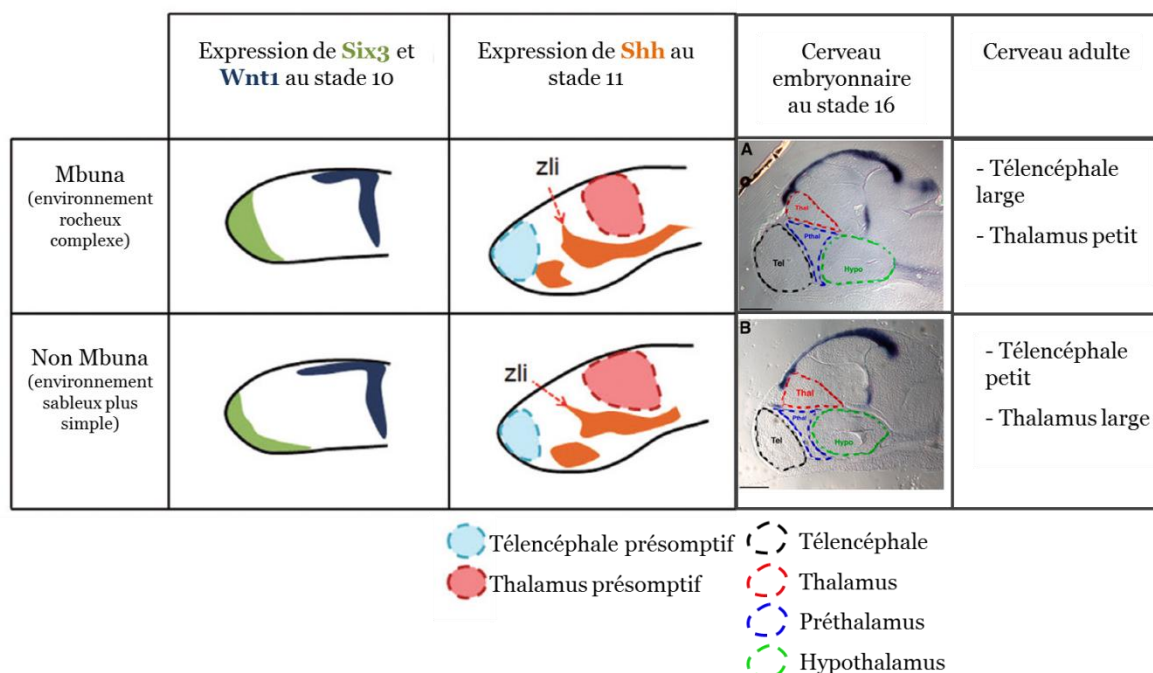


Figure 17 Des différences de régionalisation précoces du tube neural expliquent les différences de taille des régions du cerveau adulte chez les cichlidés du lac Malawi. D'après (Rétaux et al., 2013; Sylvester et al., 2010, 2013).

Plus récemment, des différences de régionalisation au sein du télencéphale ont également été expliquées par des différences de signalisation. Chez les Mbuna, le sous pallium est étendu aux dépens du pallium, comparé aux non Mbuna. Cette différence s'explique par un territoire d'expression plus large de Shh pendant la neurulation, et par une expression plus tardive de Wnt8b (Sylvester et al., 2013).

Toutes ces modifications d'expression de molécules signalisatrices proviennent probablement de mutations dans des séquences régulatrices.

Comment les séquences régulatrices évoluent-elles ? Certains exemples mieux connus permettent de dégager quelques grandes idées.

Ainsi, les mâles chez la mouche drosophile *D. biarmipes* ont au bout de l'aile une tâche sombre, contrairement à d'autres drosophiles. Cette tâche est due à la synthèse de pigments noirs, voie de synthèse à laquelle participe la protéine codée par le gène *yellow*. L'expression de *yellow* dans la pupa de *D. biarmipes* préfigure la position de la tâche pigmentée chez l'adulte. Or, chez *D. biarmipes*, il y a en amont du gène *yellow* un élément régulateur ou enhancer (appelé *spot*) qui est suffisant pour provoquer la transcription de *yellow* dans la future région pigmentée. Cet élément est absent chez les espèces de Drosophiles sans pigmentation sur l'aile (**Fig 18**). Ici, un nouvel enhancer a donc évolué, de nouveaux sites de fixation pour des facteurs de transcription (Engrailed) sont apparus dans une séquence qui n'en possédait pas (Gompel, Prud'homme et al., 2005).

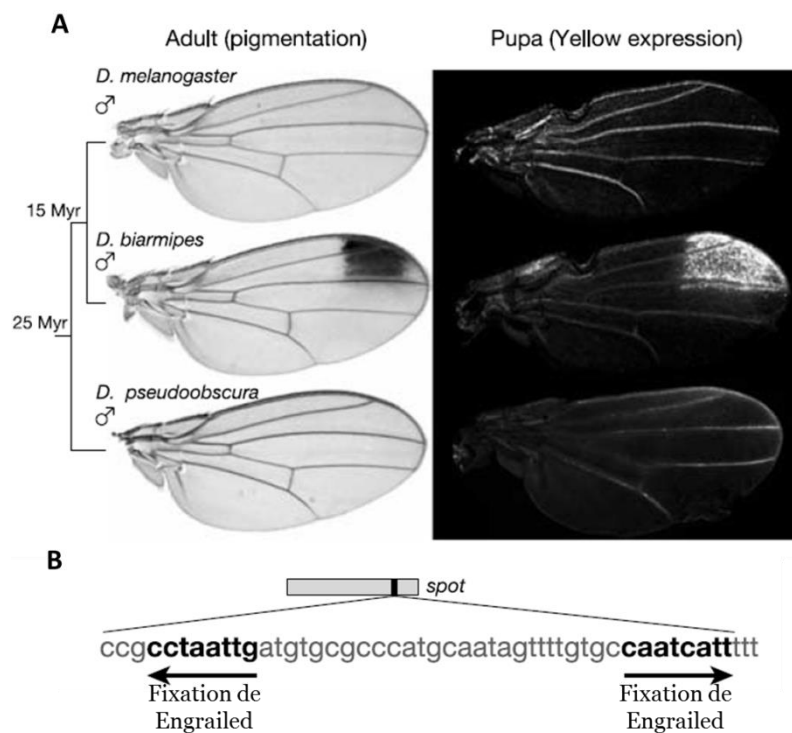


Figure 18 **A** L'expression de *yellow* dans l'aile préfigure le patron de pigmentation. **B** Elément *spot* du gène *yellow* de *D. biarmipes*. D'après (Gompel, Prud'homme et al., 2005).

Chez l'épinoche *Gasterosteus aculeatus*, certaines populations d'eau douce ont perdu les épines pelviennes, des structures apparemment impliquées dans la défense contre les prédateurs pour les populations marines. Des études de QTL ont permis de montrer qu'une région du génome avait un effet majeur sur la perte du squelette pelvien. Cette région comporte le gène *Pitx1*, un gène impliqué dans le développement du squelette des membres postérieurs chez la souris. Or, chez les épinoches

d'eau douce à pelvis réduit, *Pitx1* n'est pas exprimé dans les précurseurs des nageoires pelviennes, contrairement à la situation chez les épinoches marines (Shapiro et al., 2004, **Fig 19**). C'est une délétion d'un enhancer de *Pitx1* spécifiquement actif dans le bourgeon pelvien qui conduit à la perte du squelette pelvien chez les épinoches d'eau douce. En revanche, tous les autres enhancers de *Pitx1*, qui contrôlent son expression dans d'autres régions de l'organisme comme l'hypophyse, l'œil ou les arcs branchiaux, sont intacts chez l'épinoche d'eau douce. De manière remarquable, dans différentes populations d'eau douce, la délétion de l'enhancer du bourgeon pelvien n'est pas la même : il y a donc eu perte de cet élément dans plusieurs populations parallèlement, ce qui pourrait suggérer que ce changement est adaptatif (Chan et al., 2010). D'ailleurs, au niveau de cette région régulatrice, il y a perte de variabilité (l'hétérozygotie est faible), ce qui est une signature de sélection.

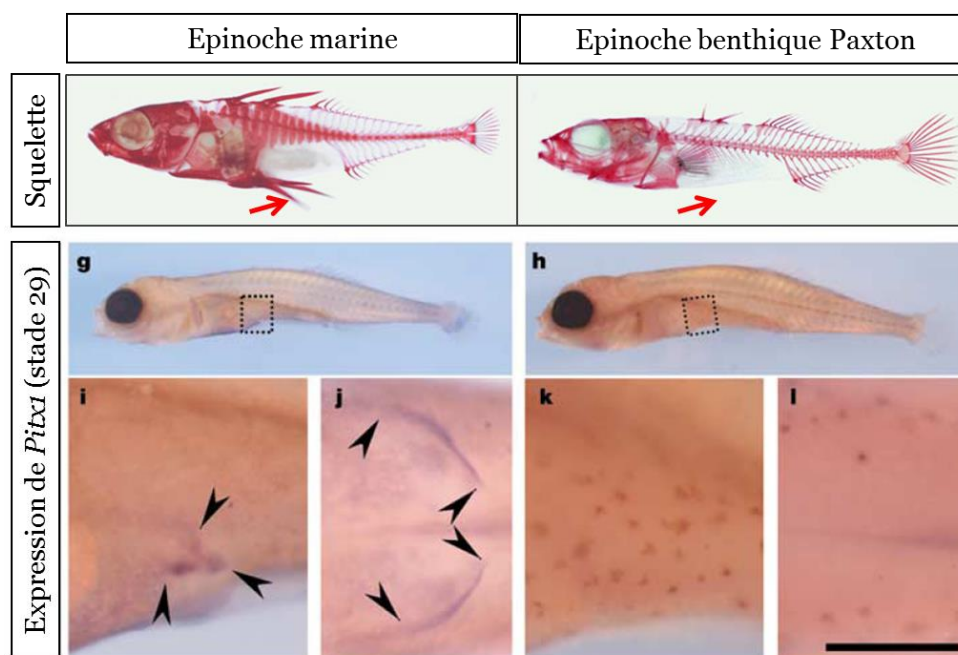


Figure 19 Perte de l'épine pelvienne chez l'épinoche benthique Paxton et expression de *Pitx1*.
D'après (Shapiro et al., 2004).

Des modifications très réduites dans des séquences régulatrices peuvent expliquer des modifications morphologiques même à grande échelle évolutive. En effet, c'est un simple polymorphisme dans une région régulatrice qui explique que les serpents n'aient pas de vertèbres sans côtes (pas de vertèbres lombaires). Chez les Vertébrés, le facteur de transcription *Hoxa10* est généralement impliqué dans la répression de la formation des côtes au niveau lombaire. Il réprime en effet l'expression de *Myf5* dans les myotomes hypaxiaux, les précurseurs des muscles intercostaux. *Myf5* active le développement de ces muscles, et indirectement le développement des côtes qui dérivent des sclérotomes adjacents. Or, chez les serpents, un polymorphisme d'un nucléotide dans un

enhancer de *Myf5* empêche la fixation de *Hoxa10*, et rend *Myf5* « insensible » à la présence de *Hoxa10*. Le même polymorphisme a été détecté chez plusieurs mammifères afrothériens dont l'éléphant et le lamantin, qui ont eux aussi des cages thoraciques allongées (Guerreiro et al., 2013). Un détail étonnant est que *Hoxb6*, le facteur Hox responsable de l'activation de *Myf5* dans les vertèbres thoraciques, est toujours capable d'activer *Myf5* chez le serpent. Or chez la souris, *Hoxa10* et *Hoxb6* se lient à la même séquence. Cette apparente incohérence est résolue chez le serpent par le fait que *Hoxb6* se lie à *Pax3*, lui-même fixé sur son site de liaison, et active *Myf5* sans interagir directement avec l'ADN (Fig 20).

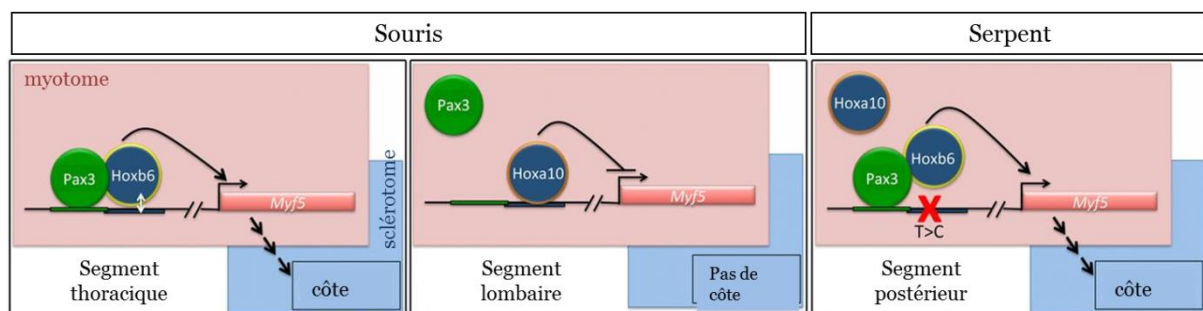


Figure 20 Régulation de *Myf5* chez la souris et le serpent. D'après (Mansfield, 2013).

On a donc vu que l'évolution des séquences *cis* régulatrices peut se faire par perte ou par gain d'enhancers ou de sites de liaison. L'évolution des séquences *cis* régulatrices a des effets moins drastiques que celle des séquences codantes : elle modifie l'expression des gènes dans des tissus particuliers. Ceci est lié à la nature modulaire des séquences *cis* régulatrices : souvent, elles sont composées de plusieurs enhancers tissu-spécifiques, ce qui conduit à ce que les mutations modifient l'expression dans un tissu sans affecter les autres.

De manière générale, nous avons vu que l'évolution morphologique impliquait principalement l'évolution de la séquence ou de l'expression de gènes de développement (comme *Pad*, *Pitx1*, *Myf5*) ou de gènes de signalisation (comme *Bmp4*, *Shh*, *Wnt1*, *Wnt8b*). Et l'évolution des séquences *cis* régulatrices semble plus fréquente, peut-être à cause de leur nature modulaire, excepté en ce qui concerne l'évolution de la pigmentation. Cette idée est défendue par Sean Carroll entre autres : “(1) form evolves largely by altering the expression of functionally conserved proteins; and (2) such changes largely occur through mutations in the *cis*-regulatory regions of mosaically pleiotropic developmental regulatory genes and of target genes within the vast regulatory networks they control”¹ (Carroll, 2008).

1 : « (1) la forme évolue largement par altération de l'expression de protéines conservées fonctionnellement ; et (2) des changements de ce type se produisent principalement grâce à des mutations dans les régions *cis*-régulatrices de gènes régulateurs du développement pléiotropiques et de gènes cibles au sein des larges réseaux de régulation qu'ils contrôlent. »

III. Génomique comparée et évolution moléculaire

a. Génomique comparée

Les études d'évo dévo présentées ci-dessus s'intéressaient à des différences morphologiques, et tentaient de les expliquer par des différences développementales, allant parfois jusqu'à déterminer les mutations en cause. L'approche de génomique comparée est différente : elle consiste à comparer les séquences génomiques d'espèces différentes et à déterminer les régions les plus divergentes. Une fois ces régions localisées, les gènes qui les composent peuvent être listés, ainsi que les fonctions des protéines qu'ils encodent, ce qui permet de savoir si certaines catégories de gènes sont enrichies dans ces régions. C'est donc une approche sans *a priori*, qui peut permettre de pointer des mutations importantes pour certaines différences phénotypiques, sans passer par la sélection de gènes candidats.

La génomique comparée a pris récemment un essor considérable, grâce au développement des techniques de séquençage haut débit, qui permettent l'obtention de plus en plus facile des séquences génomiques et transcriptomiques.

L'épinoche dont nous avons parlé plus tôt a été étudiée par ce type d'approche : des individus marins et d'eau douce ont vu leur génome séquencé (Jones et al., 2012, **Fig 21**).

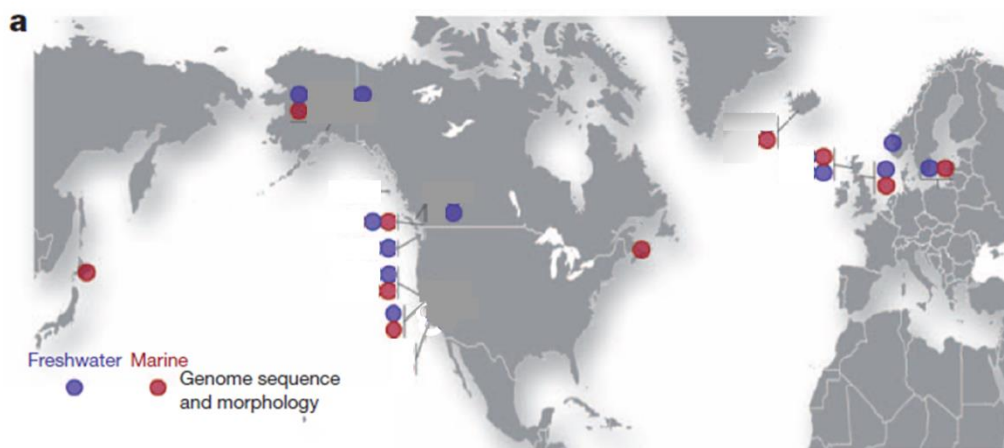


Figure 21 Localités d'échantillonnage des épinoches séquencées. Points bleus pour les épinoches d'eau douce, points rouges pour les marines. D'après (Jones et al., 2012).

En fait, les épinoches d'eau de mer ont envahi de manière répétée différents milieux d'eau douce : les épinoches d'eau douce ne forment donc pas un groupe monophylétique, et leurs génomes ne sont pas plus proches entre eux qu'ils ne le sont des génomes d'individus marins. Les positions dans le

génomique où tous les individus d'eau douce se ressemblent par opposition aux individus d'eau de mer (appelés allèles écotypiques) correspondent donc à des évolutions parallèles, ce qui suggère que la modification de séquence observée est adaptative. 90 régions génomiques présentent une forte divergence entre les individus des deux milieux. Dans ces régions, on retrouve des gènes déjà connus pour expliquer certaines différences morphologiques entre les formes marines et d'eau douce, comme le gène *Eda* codant pour l'ectodysplasine, responsable de la perte des plaques osseuses chez les épinoches d'eau douce. Les gènes de ces régions ont ensuite été annotés selon leur fonction dans d'autres espèces : cette annotation est appelée GO term (Gene Ontology term). Dans les régions écotypiques, il y a un enrichissement de gènes impliqués dans la réponse cellulaire aux signaux, les interactions comportementales entre organismes, le métabolisme des acides aminés et des acides gras, les jonctions intercellulaires et la signalisation WNT. Certaines de ces catégories peuvent être expliquées : ainsi, *Wnt7b* et *Wnt11* sont impliqués dans le développement des reins, et cet organe produit un volume d'urine beaucoup plus important chez les poissons d'eau douce que chez ceux d'eau de mer. La plupart des allèles écotypiques semblent être dans des régions régulatrices, ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle l'adaptation passe principalement par l'évolution des séquences régulatrices. D'ailleurs, les gènes présents dans les régions divergentes sont enrichis en gènes différentiellement exprimés entre les 2 formes. L'évolution de la régulation de l'expression des gènes aurait donc eu un rôle important dans l'évolution parallèle des épinoches d'eau douce.

Le rat-taupe, *Heterocephalus glaber*, un Mammifère des régions arides du Kenya, de la Somalie, et de l'Éthiopie, vit en colonies, composées de 75 à 80 individus, dans des galeries souterraines (Fig 22). L'adulte a des yeux malformés, jouit d'une exceptionnelle longévité et résiste au cancer. Son génome a été séquencé, et comparé à celui d'autres Mammifères connus (Kim et al., 2011). L'analyse des séquences des gènes a permis de déterminer lesquels étaient des pseudogènes (gènes avec des décalages du cadre de lecture ou des codons stop prématurés) chez le rat-taupe. En particulier, 10% des gènes impliqués dans la perception visuelle sont inactivés ou manquants. Les auteurs ont ensuite déterminé quels gènes étaient sous sélection positive en utilisant une méthode basée sur les taux de substitutions synonymes et non synonymes. Parmi ceux-ci, ils ont trouvé 2 gènes impliqués dans la régulation de la longueur des télomères, longueur qui diminue au cours de la vie et qui semble cruciale pour le vieillissement cellulaire. Les modifications de ces 2 gènes pourraient expliquer partiellement la longévité des rats-taupes. L'expression des gènes change peu avec l'âge des animaux, beaucoup moins que pour les autres Mammifères. En particulier, *Smad3*, un gène dont l'expression diminue avec l'âge chez les humains, voit son expression augmenter chez le rat-taupe. Or *Smad3* tend à ralentir le cycle cellulaire, et donc à protéger du cancer.



Figure 22 Morphologie du rat-taupe.
D'après (Catania and Remple, 2002).

Un autre résultat intéressant concerne la diversité génétique : en se basant sur le taux de positions hétérozygotes, il semble que les rats-taupes aient une diversité génétique très faible (aussi faible que celle des humains). Or, le mode de reproduction très particulier des rats-taupes (une seule femelle de chaque colonie se reproduit) tend à produire de la consanguinité. Cependant, il faut noter que l'individu séquencé provenait d'un élevage, et que la diversité génétique pourrait s'être effondrée au sein de l'élevage en quelques générations.

Le génome du coelacanthé a été séquencé récemment (Amemiya et al., 2013). Cet animal est un Sarcoptérygien (« poisson » à nageoires lobées) non Tétrapode, comme le dipneuste (**Fig 23A**). Le premier individu a été décrit en 1938, alors que l'on pensait le groupe des coelacanthés éteint depuis 70 millions d'années. De plus, sa morphologie externe est très proche de celle des fossiles auxquels il est apparenté, ce qui lui a valu la dénomination (incorrecte) de « fossile vivant ». Un autre intérêt de cet animal est que l'ancêtre commun qu'il partage avec les Tétrapodes était proche de « conquérir » le milieu aérien. Le séquençage de son génome a permis de préciser sa position phylogénétique : le dipneuste est plus proche des Tétrapodes que le coelacanthé. Des analyses phylogénomiques ont également montré que les protéines du coelacanthé évoluent lentement (d'où, peut-être, sa ressemblance avec des fossiles) : le taux de substitution par site, comparé au groupe externe actinoptérygien) est de 0.89 pour le coelacanthé contre 1.05 pour le dipneuste et 1.21 pour les Mammifères.

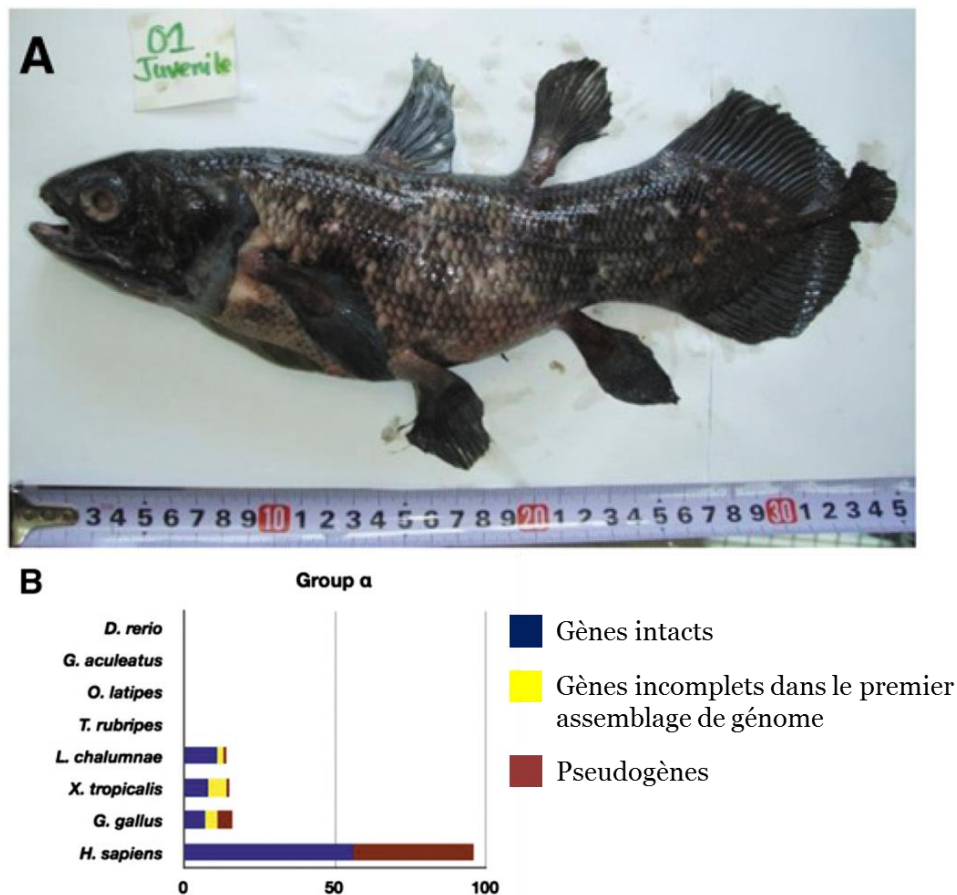


Figure 23 **A** Morphologie du coelacanth *L. chalumnae*. **B** Expansion de la famille α des ORs (récepteurs d'odorants) chez les Sarcoptérygiens. D'après (Nikaido et al., 2013).

L'analyse des séquences génomiques a également permis d'étudier plus spécifiquement la famille des récepteurs olfactifs, qui a beaucoup évolué chez les Tétrapodes (qui peuvent détecter des odorants volatils, alors que les Actinoptérygiens perçoivent des molécules dissoutes dans l'eau). Les Tétrapodes ont ainsi des expansions spécifiques de certaines familles de récepteurs, comme certains VIRs, et les sous familles α et γ des ORs, ce qui doit leur permettre de détecter des odorants volatils. Or le coelacanth a dans son génome des gènes VIR proches des Tétrapodes, et une amplification des sous familles α et γ des ORs (Nikaido et al., 2013, **Fig 23B**). Cela modifie donc le scénario évolutif imaginé auparavant : l'expansion de ces familles de chimiorécepteurs ne s'est probablement pas produite au moment de la colonisation du milieu terrestre ; en fait, elle préexistait chez l'ancêtre des Sarcoptérygiens. Les « nouveaux » gènes ont ensuite été réutilisés (cooptés) pour la perception des molécules volatiles.

Prenons un dernier exemple, de microévolution cette fois. Une étude de génomique comparée sur 92 races de chiens a permis de relier certaines caractéristiques de gènes de développement à des caractères morphologiques des membres et du crâne (Fondon and Garner, 2004). En effet, plusieurs

gènes de développement comportent des répétitions en tandem d'acides aminés dans la séquence protéique, répétitions dont le nombre peut varier rapidement au cours de l'évolution. En l'absence de sélection, ces répétitions peuvent muter. Au contraire, des événements récents d'expansion conduisent à des répétitions non dégradées. Chez les chiens, la « pureté » des répétitions est supérieure à celle décrite chez l'Homme, ce qui indique une sélection récente. Pour 5 gènes (*Six3*, *Hoxa7*, *Runx2*, *Hoxd8*, et *Alx4*), la variabilité du nombre de répétitions selon les races est particulièrement importante. Ainsi, chez le chien de montagne des Pyrénées, une délétion de 51bp dans *Alx4* semble associé à la polydactylie du doigt I (le doigt I est dupliqué). Les individus sans polydactylie ne portent pas cet allèle, et les souris *Alx4*^{-/-} ont un phénotype de polydactylie.

Chez l'Homme, des mutations dans *Runx2* sont associées à des malformations craniofaciales. Cette étude chez le chien montre une corrélation entre le rapport des répétitions polyglutamine sur les polyalanine dans *Runx2* et la clinorhynchie (l'angle entre la base du tronc cérébral et l'os maxillaire) (Fig 24).

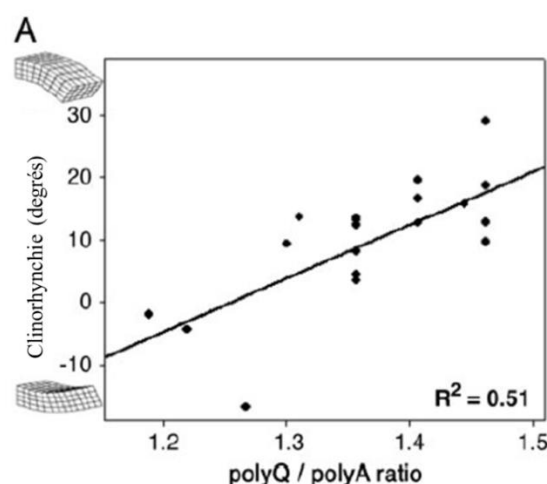


Figure 24 Relation entre la longueur des motifs polyQ et polyA de *Runx2* et un caractère craniofacial. D'après (Fondon and Garner, 2004).

La génomique comparée permet de préciser les phylogénies d'espèces, et d'inférer des hypothèses sur le régime de reproduction à partir de la diversité génétique. De plus, à partir d'une étude sans *a priori*, elle permet de découvrir des gènes candidats pour être sous sélection, et qui peuvent donc avoir participé à l'acquisition de certains phénotypes. Bien sûr, ce genre d'approche nécessite d'être validée par des études fonctionnelles, pour confirmer l'implication de certains candidats.

b. Transcriptomique comparée

La transcriptomique comparée peut constituer une alternative à la génomique comparée pour répondre à des questions d'évolution moléculaire des séquences codantes, dans le cas d'espèces non modèles dont le génome n'est pas séquencé. En effet, assembler *de novo* un transcriptome est beaucoup plus simple que d'assembler un génome complet.

Ainsi, le transcriptome des feuilles et des fleurs de deux espèces proches de primevères, *Primula poissonii* et *Primula wilsonii*, a été séquencé (Zhang et al., 2013). *P. poissonii* se trouve dans des prés alpins à une altitude de 3200–3500 m. *P. wilsonii* pousse en milieu ouvert dans des forêts de feuillus à une altitude de 2500 m environ (**Fig 25**). Cette étude transcriptomique a permis, pour ces espèces non modèles, d'obtenir la séquence de nombreuses séquences codantes, ce qui constitue une ressource importante pour la communauté travaillant sur ces plantes.

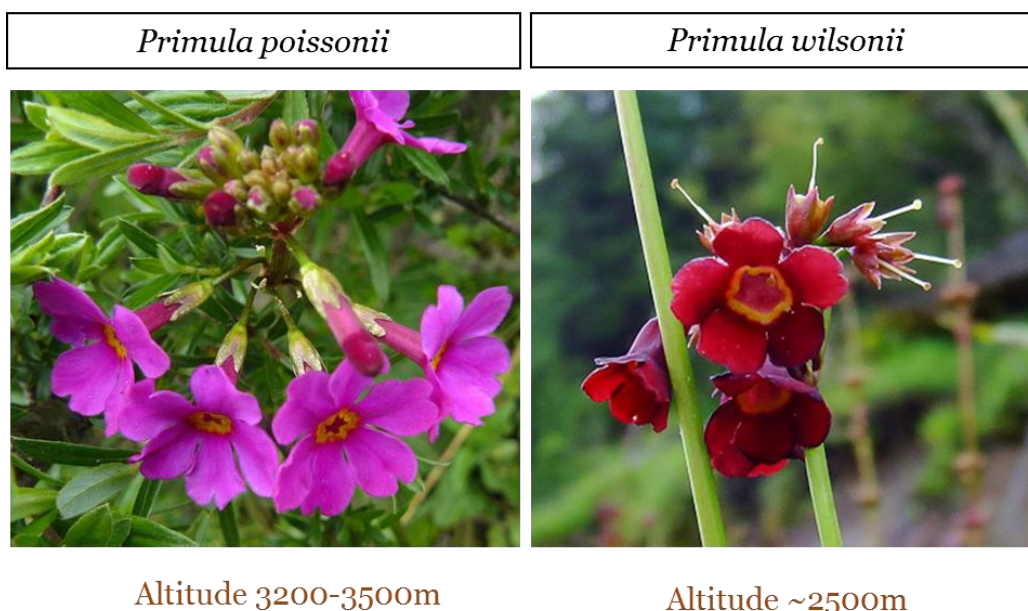


Figure 25 Morphologie de deux espèces proches de primevères dont le transcriptome a été séquencé. Photographies d'après (Eveleigh, 2000).

De plus, le taux de substitutions synonymes a pu être utilisé pour estimer le temps de divergence entre les deux espèces (environ 1 million d'années). D'autre part, une analyse de dN/dS a permis de déterminer quels gènes sont sous sélection positive entre ces deux espèces. Parmi ceux-ci, les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et dans la résistance au stress étaient particulièrement nombreux chez l'espèce alpine. Or *P. poissonii* s'est adapté à des milieux d'altitude particulièrement élevée, avec des radiations ionisantes délétères pour l'ADN. Ce type d'analyse peut donc permettre de trouver des gènes candidats pour l'adaptation à des milieux différents.

La transcriptomique comparée permet aussi de comprendre l'évolution de l'expression des gènes. Elle a permis de revenir sur l'idée d'un stade « phylotypique », ce stade de développement embryonnaire pour lequel tous les embryons d'un phylum donné se ressembleraient, une idée héritée de Haeckel. En effet, une manière de vérifier qu'un stade de développement est particulièrement conservé entre espèces est d'étudier la conservation de l'expression des gènes.

Une étude récente s'est appuyée sur les transcriptomes développementaux des embryons de souris, poulet, grenouille et poisson-zèbre à 4 stades différents (Irie and Kuratani, 2011). Elle a montré que le transcriptome le plus conservé correspond au stade pharyngula (le stade d'apparition des arcs pharyngiens, à la fin de la somitogenèse, au moment de l'expression des gènes Hox le long de l'axe antéro-postérieur) (**Fig 26**).

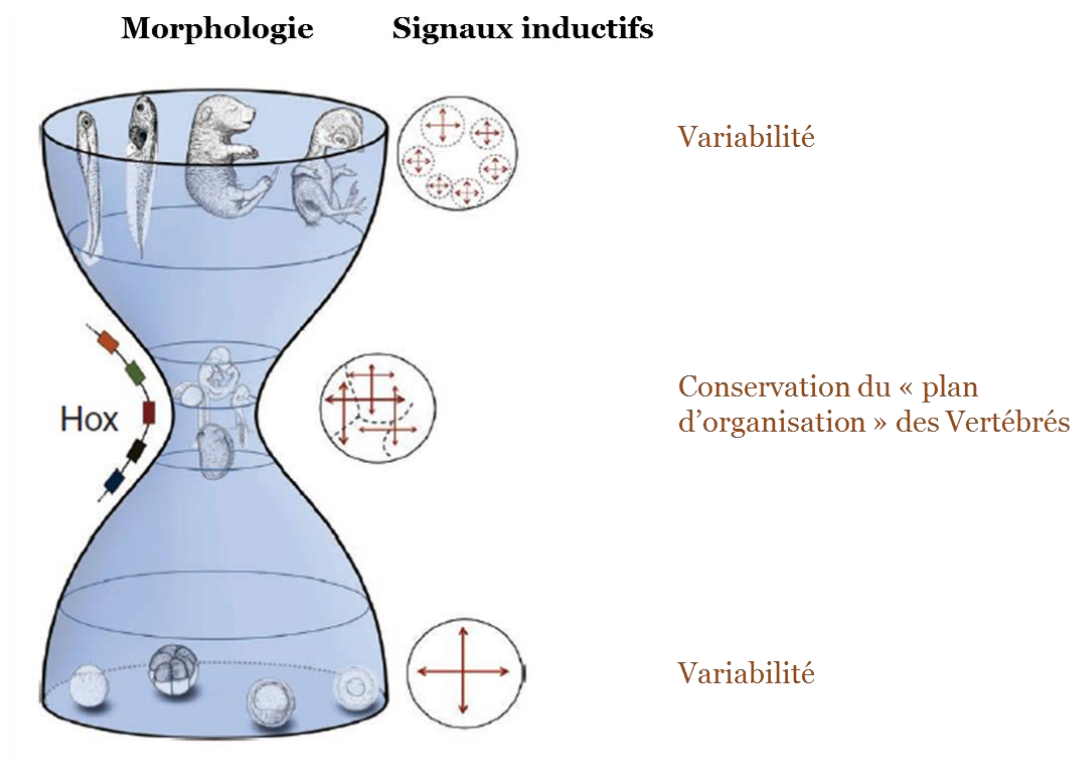


Figure 26 Modèle en « sablier » du développement embryonnaire des Vertébrés. D'après (Irie and Kuratani, 2011)

Les gènes dont l'expression est conservée à ce stade entre les différents Vertébrés sont en effet les gènes Hox, mais aussi des gènes de signalisation (comme *Dkk*, *FGF8*, *Fzd2*, *ptch2*, *FGFRL1*) et des facteurs de transcription (comme *FoxG1*, *Pax6*, *myf6*, *Islet1* et *Emx2*). Il semble donc que le stade pharyngula soit celui où il y a le plus de mécanismes développementaux communs entre différentes espèces de Vertébrés. Cette étude supporte le modèle en « sablier » : les stades de développement

précoces sont assez variables (les modes de gastrulation en particulier), les stades tardifs également (ils expliquent les différences entre les adultes des différentes espèces), et le stade pharyngula est le plus contraint, celui qui supporte le moins de variations.

Enfin, les études de transcriptomique permettent également de comprendre certaines différences morphologiques. Ainsi, le transcriptome de la tête d'un coléoptère cavernicole des Etats Unis, *Ptomaphagus hirtus*, a été séquencé (Friedrich et al., 2011). Ce scarabée a des yeux réduits et non pigmentés en comparaison d'espèces proches comme *P. cavernicola*, un scarabée capable de vivre à la fois dans et en dehors des grottes (**Fig 27**). L'analyse de ce transcriptome devait donc permettre d'établir quels gènes sont correctement exprimés dans les yeux réduits de *P. hirtus*.

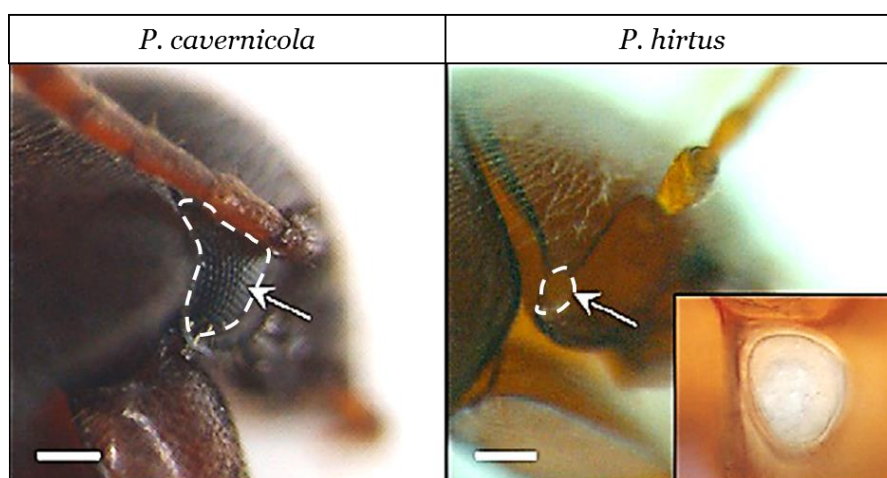


Figure 27 Morphologie du scarabée cavernicole *Ptomaphagus hirtus*, et d'une espèce proche *P. cavernicola*. D'après (Friedrich et al., 2011).

Ainsi, par comparaison avec les transcriptomes d'autres insectes, il a pu être établi que la plupart des gènes impliqués dans la phototransduction sont exprimés chez *P. hirtus*. Cependant, les protéines nécessaires à la formation correcte des rhabdomères, c'est-à-dire les extensions apicales des photorécepteurs, composées de nombreuses villosités, ne sont pas toutes exprimées : par exemple, les transcrits codant pour la protéine membranaire prominine sont absents du transcriptome. Plusieurs gènes impliqués dans la pigmentation de l'œil ne semblent pas exprimés non plus : des transporteurs des précurseurs des pigments comme *white* et *scarlet*, et des enzymes de la voie de synthèse des pigments comme *prune* et *cinnabar*. Ces modifications d'expression constituent des pistes à explorer pour expliquer la quasi-absence de l'œil chez *P. hirtus*. En particulier, il faudrait maintenant savoir si les gènes eux-mêmes sont affectés (délétion ou pseudogénisation par exemple), ou si seule leur expression est perdue chez *P. hirtus*.

B. Développement de l'œil

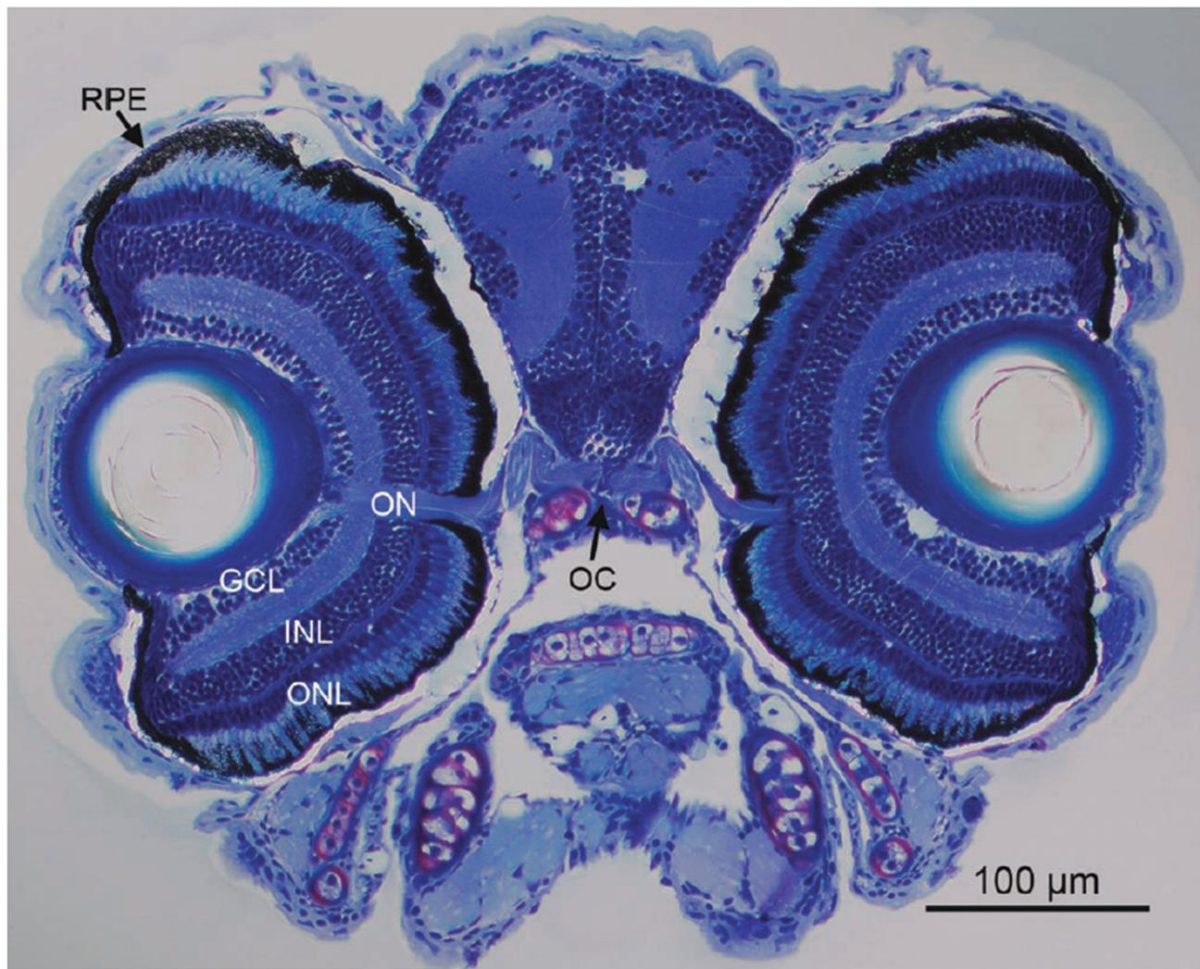


Illustration Coupe transversale d'une tête de poisson-zèbre de 6dpf, montrant les yeux et leur connexion avec le cerveau. RPE épithélium pigmenté de la rétine, ON nerf optique, OC chiasma optique, GCL couche des cellules ganglionnaires, INL couche nucléaire interne, ONL couche nucléaire externe. D'après (Gestri et al., 2012).

I. Généralités sur le développement de l'œil de Vertébré

a. Introduction au système visuel des Téléostéens

L'œil de téléostéen est un œil de Vertébré « classique », même s'il comporte quelques petites différences par rapport aux Mammifères, comme l'absence de muscles de l'iris (Soules and Link, 2005, **Fig 28**).

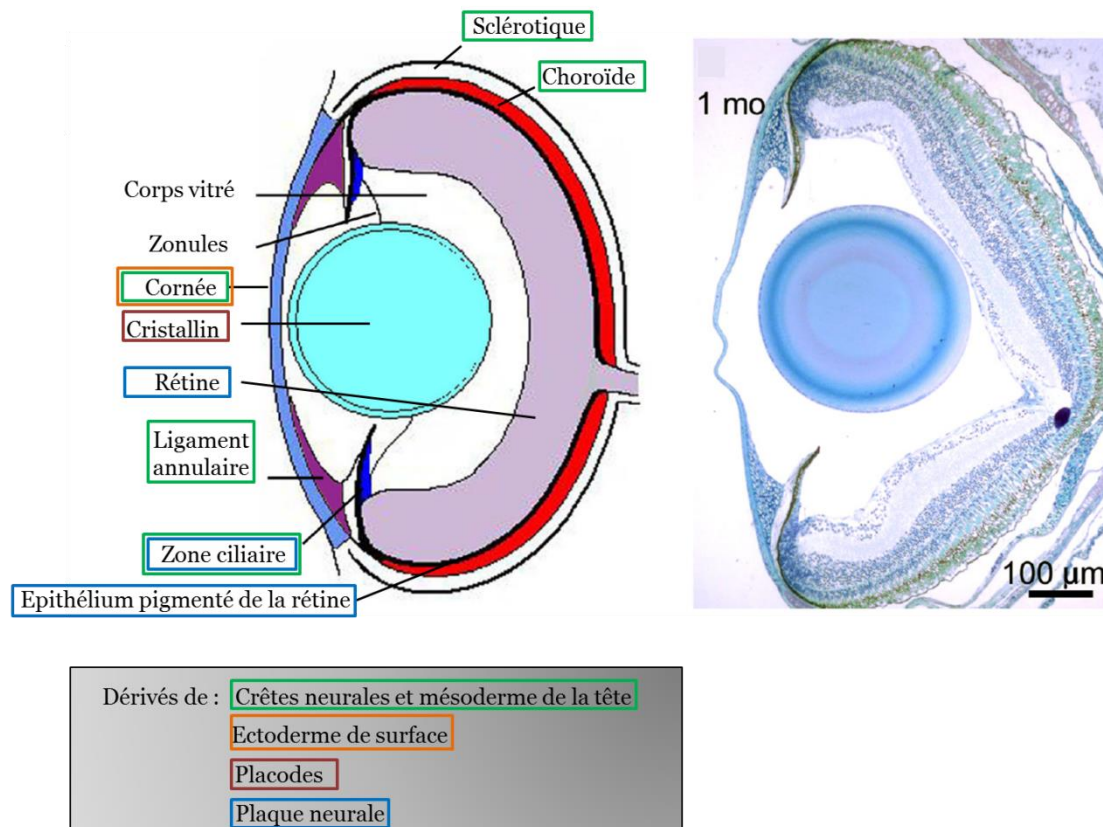


Figure 28 Anatomie d'un œil de poisson zèbre adulte. Section à travers l'œil et schéma explicatif, indiquant les origines développementales de chaque composant. D'après (Graw, 2010; Pansky, 1982; Saint-Geniez and D'Amore, 2004; Soules and Link, 2005).

Les composants principaux en sont la rétine (qui comporte les photorécepteurs), le cristallin (qui permet la mise au point de l'image) et la cornée. Chez les Mammifères, à la fois le cristallin et la cornée concentrent les rayons lumineux grâce à leurs propriétés de réfraction. Chez les poissons, c'est le rôle du cristallin seul (Graw, 2010; Soules and Link, 2005). Chez les Téléostéens, le cristallin est sphérique, dur et non déformable, et le changement de mise au point est permis par le rapprochement ou l'éloignement du cristallin de la rétine. Chez les Mammifères, le cristallin est plus plat et mou, et

les muscles accommodants en le déformant, permettent de changer la mise au point (Land and Nilsson, 2002).

La rétine comporte les photorécepteurs, cônes et bâtonnets, qui détectent la lumière. Ils transmettent des signaux aux cellules bipolaires de la couche nucléaire interne, qui transmettent eux-mêmes l'information aux cellules ganglionnaires, dont les axones forment le nerf optique. Ces axones projettent de manière topographique dans différentes régions du cerveau dont le toit optique, la structure qui serait l'homologue du colliculus supérieur des Mammifères (Gestri et al., 2012, **Fig 29**).

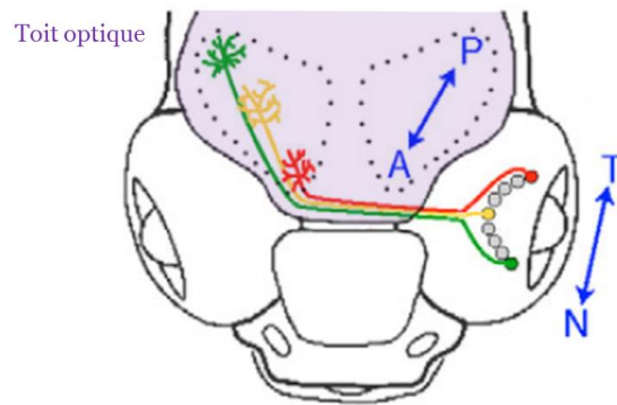


Figure 29 Schéma du circuit visuel chez le poisson zèbre, en vue dorsale. Les neurones de la rétine projettent dans le toit optique (violet), ceux situés au pôle nasal (N) de l'œil projetant dans la partie postérieure (P) du toit optique. Au contraire, les neurones de la partie temporale (T) de la rétine projettent dans la partie antérieure (A) du toit optique. D'après (Grove, 2008).

La rétine est organisée en couches : la couche nucléaire externe contient les corps cellulaires des photorécepteurs ; la couche nucléaire interne contient ceux des cellules horizontales, bipolaires et amacrines ; la couche ganglionnaire contient ceux des cellules ganglionnaires. Les couches plexiformes sont situées entre les couches nucléaires et correspondent aux connexions synaptiques entre neurones : la couche plexiforme externe est faite des connexions entre les photorécepteurs, les cellules bipolaires et les cellules horizontales ; la couche plexiforme interne comporte les connexions entre les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires (Graw, 2010, **Fig 30**).

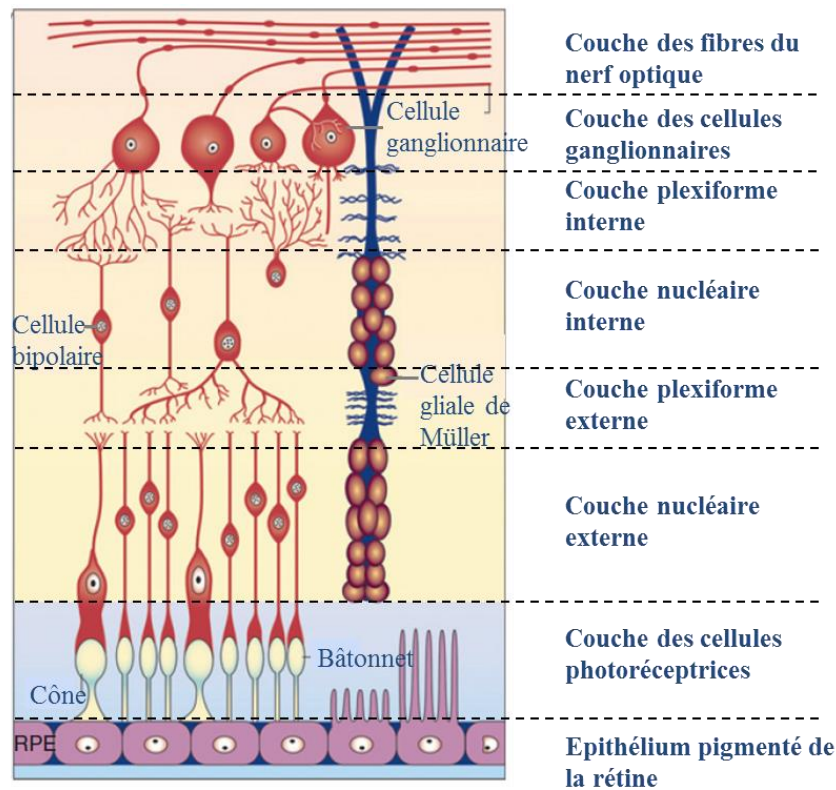


Figure 30 Organisation en couches de la rétine et principaux types cellulaires. D'après (Graw, 2010).

b. Morphogenèse de la rétine de Téléostéen

Les principaux éléments qui participent au développement de l'œil sont la plaque neurale (dont dérive de la rétine), les placodes (dont dérive le cristallin), l'ectoderme de surface (dont dérive l'épithélium de la cornée) et le mésenchyme périoculaire, formé par des cellules des crêtes neurales et du mésoderme de la tête (dont dérivent l'endothélium et le stroma de la cornée, la sclérotique et la choroïde) (Graw, 2010).

Nous allons nous attarder sur le développement de la rétine, et dans les paragraphes suivants, sur celui du cristallin.

Les rétines dérivent d'un seul champ dans la plaque neurale, le champ de l'œil, qui exprime *opl* (*odd-paired like*) et *rx3* (Loosli et al., 2003; Varga et al., 1999). Ces gènes ont une importance majeure dans le développement de l'œil : les poissons-zèbres mutants pour *rx3* ne développent pas d'œil, tandis que les mutants *opl* sont cyclopes (Graw, 2010; Loosli et al., 2003).

Pax6, souvent appelé le « gène-maître » du développement de l'œil, aussi bien chez les insectes que chez les Vertébrés, est exprimé non seulement dans l'œil en développement, mais aussi dans certaines parties du cerveau. Lorsqu'il est muté, comme chez les souris mutantes *small eye*, les yeux sont absents à la naissance (Halder et al., 1995).

Le champ de l'œil est ensuite séparé en deux par des mouvements morphogénétiques : les précurseurs de l'hypothalamus basculent vers l'avant pendant la neurulation et ceux de la rétine effectuent un mouvement latéral. Ce résultat, d'abord obtenu par des injections d'un marqueur fluorescent et des hybridations *in situ* (Varga et al., 1999), a été confirmé depuis par l'imagerie *in vivo* d'embryons de poisson-zèbre exprimant la GFP dans tous leurs noyaux et le suivi de cellules (England et al., 2006). Après la « subduction » de l'hypothalamus, les futures cellules de la rétine, séparées en deux champs, « migrent » vers les vésicules optiques (**Fig 31**).

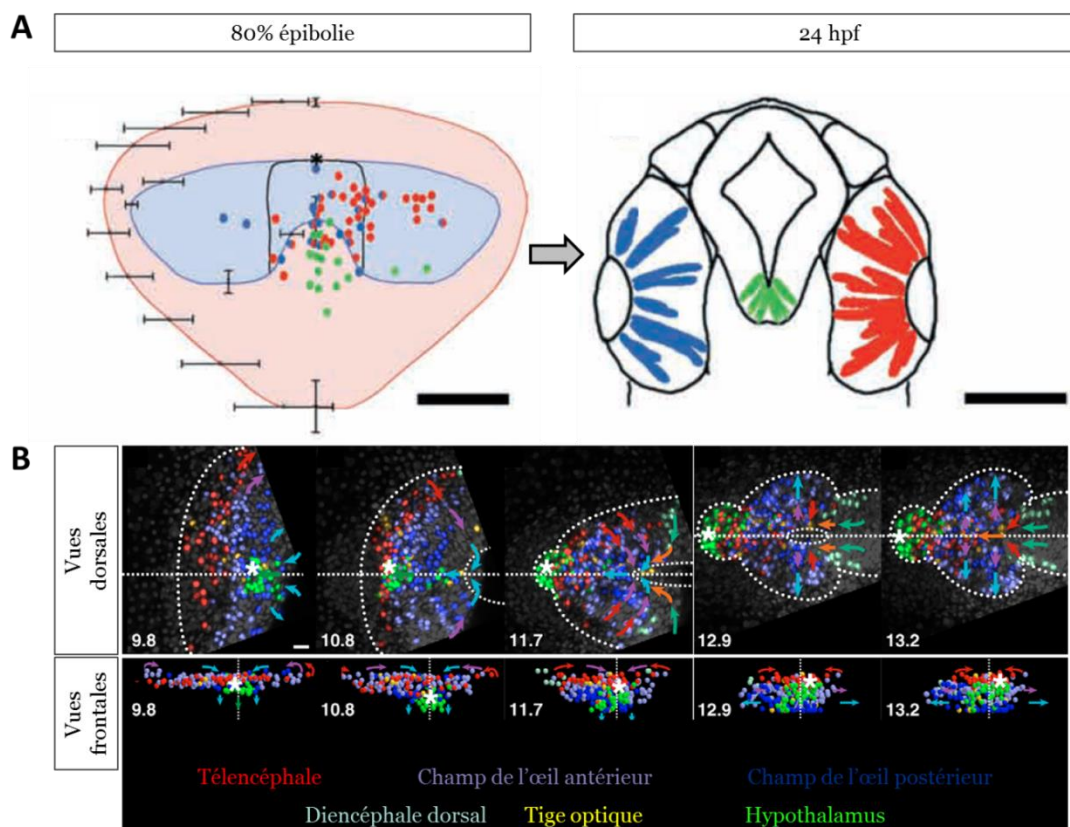


Figure 31 Cartes de devenir présomptif du champ de l'œil. **A** Carte de devenir présomptif de la plaque neurale antérieure en fin d'épibolie chez le poisson-zèbre, obtenue par injections de Rhodamine-Dextran. Vues dorsales, antérieur en haut. **B** Suivi des cellules de la plaque neurale antérieure pendant la neurulation. Pour les vues dorsales, antérieur à gauche. Pour les vues frontales, dorsal en haut. D'après (England et al., 2006; Varga et al., 1999).

Suite à la formation des vésicules optiques, la morphogénèse se poursuit. Plusieurs mouvements des cellules de la future rétine s'opèrent : un mouvement d'évagination qui se poursuit à partir du cerveau, un mouvement d'élongation vers l'arrière et latéralement, un mouvement d'enveloppement, et une rotation antérieure (Kwan et al., 2011, **Fig 32**).

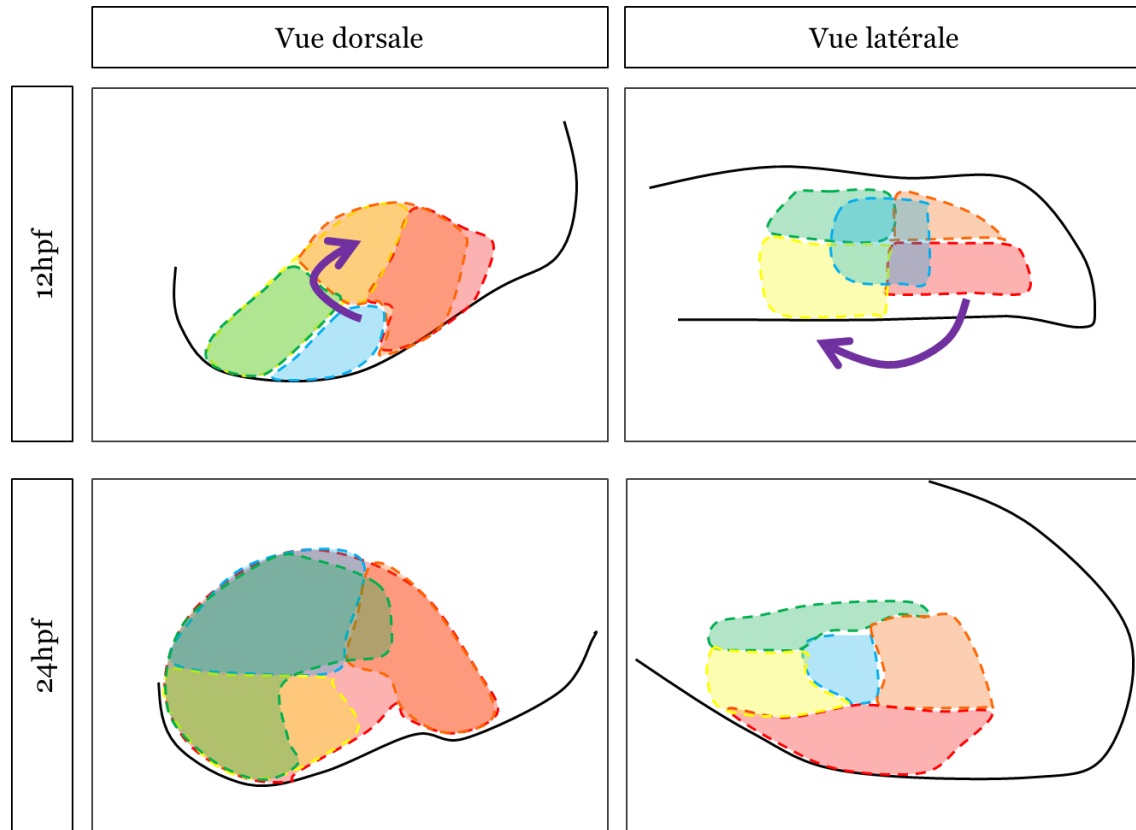


Figure 32 Cartes de devenir présomptif des vésicules optiques. Carte de devenir présomptif des vésicules optiques chez le poisson-zèbre, obtenue par imagerie 4D. Vues dorsales et latérales, antérieur à droite. D'après (Kwan et al., 2011).

Tous ces mouvements permettent la formation de cupules optiques. La couche la plus externe de ces cupules se différencie en épithélium pigmenté de la rétine (RPE), tandis que la partie interne forme la rétine neurale, et que différentes couches se forment, comportant les différents types cellulaires de la rétine (Graw, 2010).

II. Le cristallin, une structure placodale

a. Formation de la région panplacodale

À la fin de la gastrulation, l'ectoderme est subdivisé en neur ectoderme (la plaque neurale), et en ectoderme non neural (le futur épiderme). A la frontière entre ces deux domaines se forme un territoire particulier, la bordure de la plaque neurale. Cette bordure a une identité particulière, elle exprime une combinatoire de gènes (dont des facteurs de transcription) très dynamique dans l'espace et le temps. Elle est ensuite elle-même subdivisée en 2 régions : celle des crêtes neurales et la région panplacodale (Streit, 2008, **Fig 33**). C'est de la région panplacodale que dérive le cristallin.

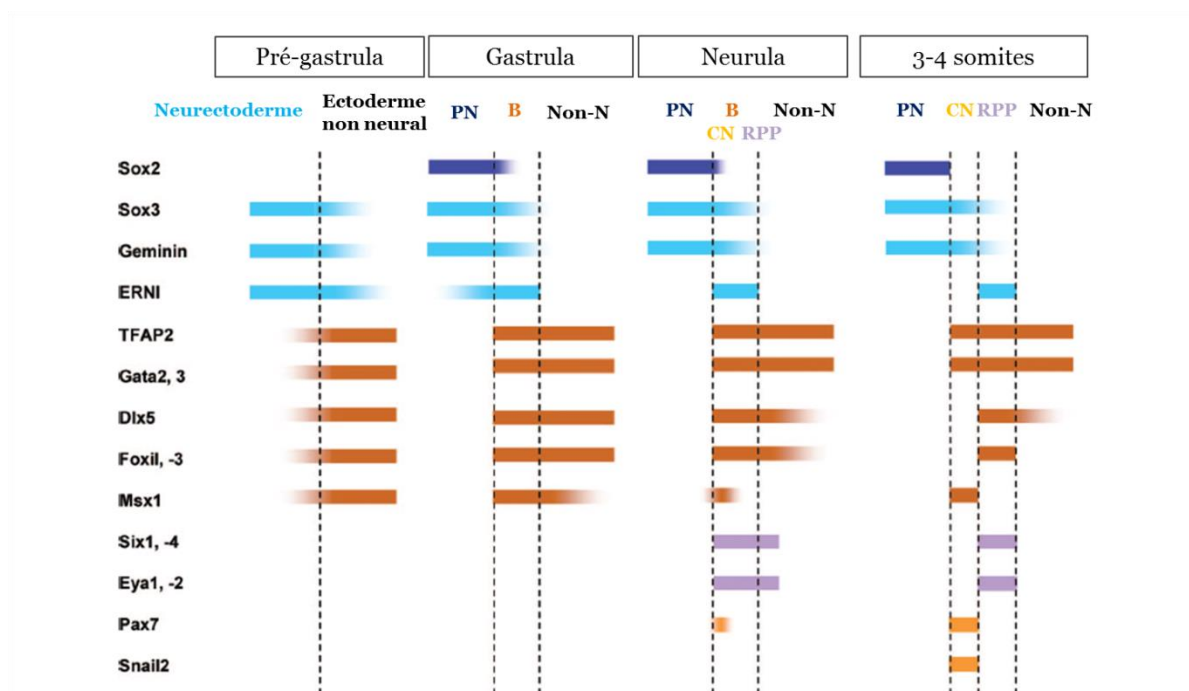


Figure 33 Cartes de l'expression des gènes dans la bordure de la plaque neurale au cours du développement. Les domaines d'expression des gènes marqueurs de la plaque neurale (PN) et de l'ectoderme non neural (Non-N) se recouvrent en fin de gastrulation, là où la bordure de la plaque neurale (B) se forme. Des gènes spécifiques de la région panplacodale (RPP) et des crêtes neurales (CN) s'expriment ensuite dans ces deux domaines. D'après (Streit, 2008).

Cette subdivision médio-latérale progressive de différentes régions au sein de l'ectoderme s'accomplit grâce à des signalisations des tissus environnants. Ainsi, les signaux FGF (issus du mésoderme) et Bmp (issus de l'ectoderme non neural) induisent la formation de la bordure de la plaque neurale. Les signalisations Bmp et Wnt (issue de l'ectoderme postérieur et du mésoderme)

répriment ensuite l'expression des gènes placodaux dans les futures crêtes neurales, tandis qu'ils sont induits par la signalisation Fgf dans la région panplacodale (Grocott et al., 2012; Streit, 2007, **Fig 34**).

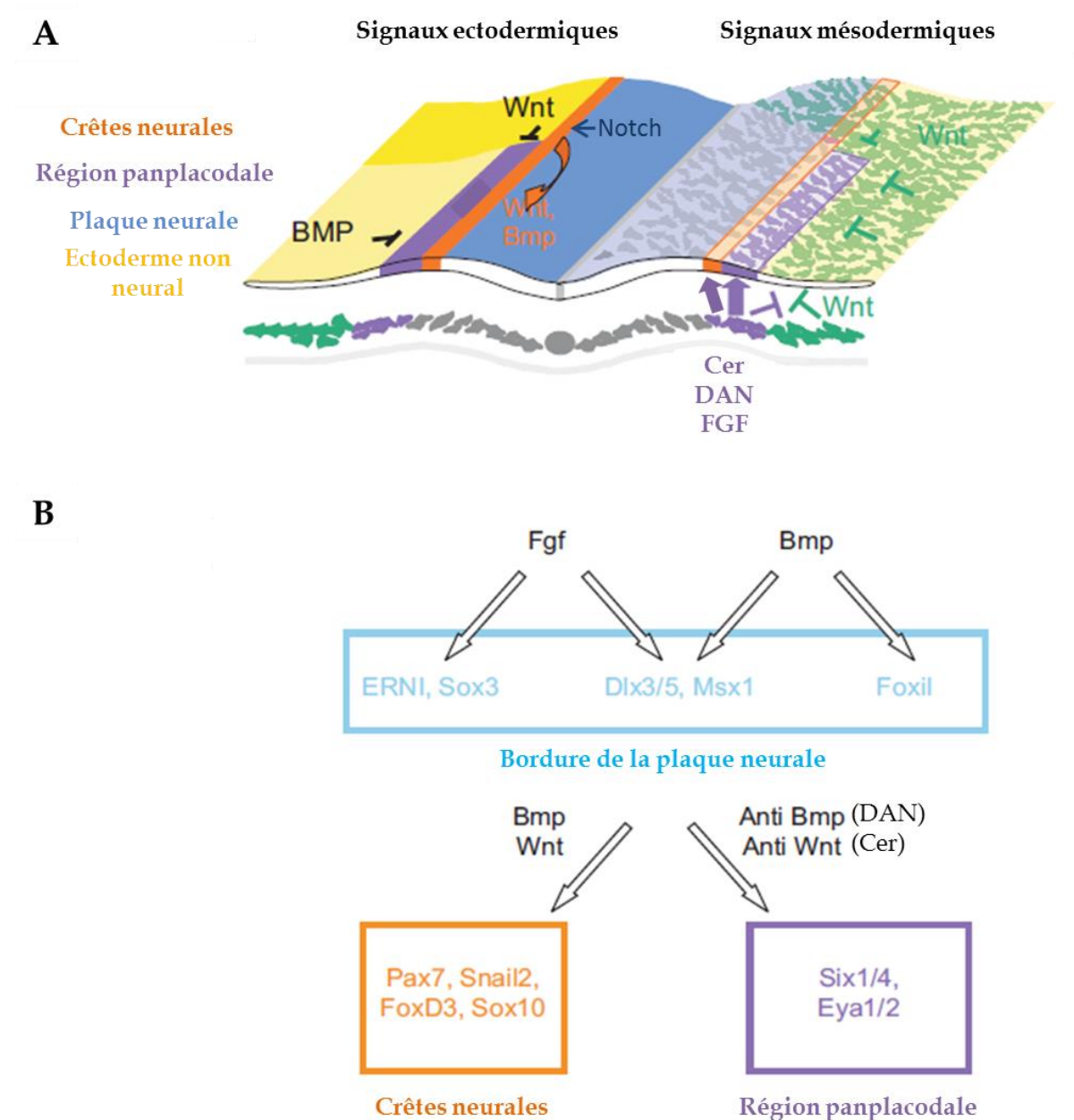


Figure 34 Signalisations permettant de définir la bordure de la plaque neurale et la région panplacodale. **A** Vue schématique d'un embryon de poulet en début de neurulation, vu depuis le pôle antérieur. Les molécules de signalisation sont représentées sur la droite ou la gauche du schéma, en fonction de leur zone de production. Les bourrelets neuraux (en orange), l'ectoderme latéral et postérieur (en jaune) et le mésoderme latéral et postérieur (en vert) produisent des signaux inhibiteurs (Wnt et BMP) de la région préplacodale. Le mésoderme situé sous la région panplacodale (en violet) sécrète des antagonistes de Wnt et Bmp, et FGF, ce qui protège la région panplacodale de ces signaux inhibiteurs. **B** Modèle du rôle des différentes signalisations dans l'induction des marqueurs spécifiques de la bordure de la plaque neurale, des crêtes neurales et de la région panplacodale. D'après (Streit, 2007).

b. Développement du cristallin à partir de la région panplacodale

Les gènes exprimés spécifiquement et exclusivement par la région panplacodale sont *Six1/4* et *Eya1/2*. De ce territoire dérivent toutes les placodes, des épaissements ectodermiques qui donnent naissance à différents organes essentiellement des sens chez les Vertébrés (le cristallin mais aussi l'épithélium olfactif, la ligne latérale, l'épithélium otique, les parties distales de ganglions crâniens et l'adénohypophyse). Au stade de la région panplacodale, les précurseurs des différentes placodes sont répartis selon une carte qui a pu être déterminée par des analyses de lignage cellulaire chez le poisson-zèbre (**Fig 35**) : ainsi, les précurseurs de l'adénohypophyse sont situés au pôle antérieur de la région panplacodale sur le plan médian ; les précurseurs olfactifs sont situés plus postérieurement et latéralement ; et les précurseurs du cristallin sont situés latéralement, en regard du champ de l'œil (Dutta et al., 2005). La régionalisation au sein du champ panplacodal est due à l'action de molécules de signalisation (comme Bmp4, Shh et Fgf8), exprimées dans la partie antérieure de l'embryon, et qui jouent le rôle de morphogènes.

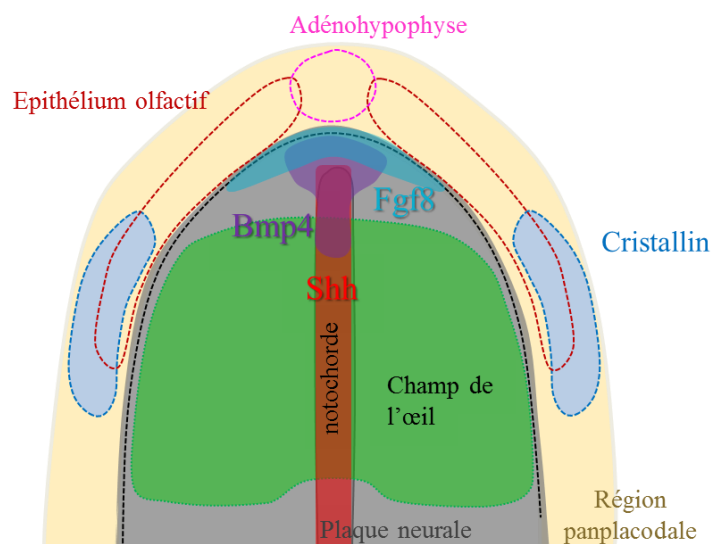


Figure 35 Carte de devenir présomptif de la plaque neurale et la région panplacodale antérieures.

Vue schématique d'un embryon de poisson-zèbre en fin de gastrulation. La zone d'expression de molécules de signalisation importantes pour la régionalisation du champ panplacodal est représentée sur la carte : Fgf8 est exprimé dans la ride neurale antérieure, Shh dans la notochorde et Bmp4 dans la plaque préchordale.

Il est à noter que l'épithélium olfactif a deux origines développementales distinctes, l'une placodale, et une autre issue des crêtes neurales (Saxena et al., 2013)

Malgré cette diversité de dérivés, toutes les placodes subissent une transition épithélio-mésenchymateuse et la plupart (à part celle du cristallin) sont neurogéniques (Streit, 2007). De plus, au

stade de la région panplacodale, elles partagent une identité commune : toutes les cellules de cette région sont par défaut destinées à devenir du cristallin. En effet, quand des cellules de la région panplacodale sont explantées et cultivées *in vitro*, elles expriment rapidement des marqueurs de la placode du cristallin (Bailey et al., 2006). Le destin « cristallin » est réprimé par des signalisations environnantes (comme Fgf8 qui induit la placode olfactive ou Shh qui promeut le destin pituitaire) (Bailey et al., 2006; Dutta et al., 2005, **Fig 36**). Ainsi, chez les mutants chez qui le signal Hh n'est pas transduit, les cellules qui devraient former l'adénohypophyse forment un cristallin ectopique (Dutta et al., 2005; Kondoh et al., 2000). Au contraire, l'injection de Shh chez le poisson-zèbre conduit à la formation de cristallins réduits (Barth and Wilson, 1995). La surexpression de Fgf3 ou Fgf8 conduit à la formation d'un cristallin réduit chez le poisson-zèbre (Nechiporuk et al., 2007).

La signalisation Bmp au contraire semble promouvoir le destin cristallin. Bmp7 est exprimé au stade panplacodal dans l'ectoderme de surface de la tête (Wawersik et al., 1999). Or chez des souris Bmp7^{-/-}, la placode du cristallin ne se développe pas : le territoire de la placode du cristallin n'exprime pas certains marqueurs typiques comme Sox2. D'autre part, *in vitro*, des explants de la région panplacodale expriment uniquement des marqueurs de cristallin s'ils sont exposés pendant plusieurs heures à Bmp4 et ceux de la placode olfactive sont réprimés (Sjödahl et al., 2007).

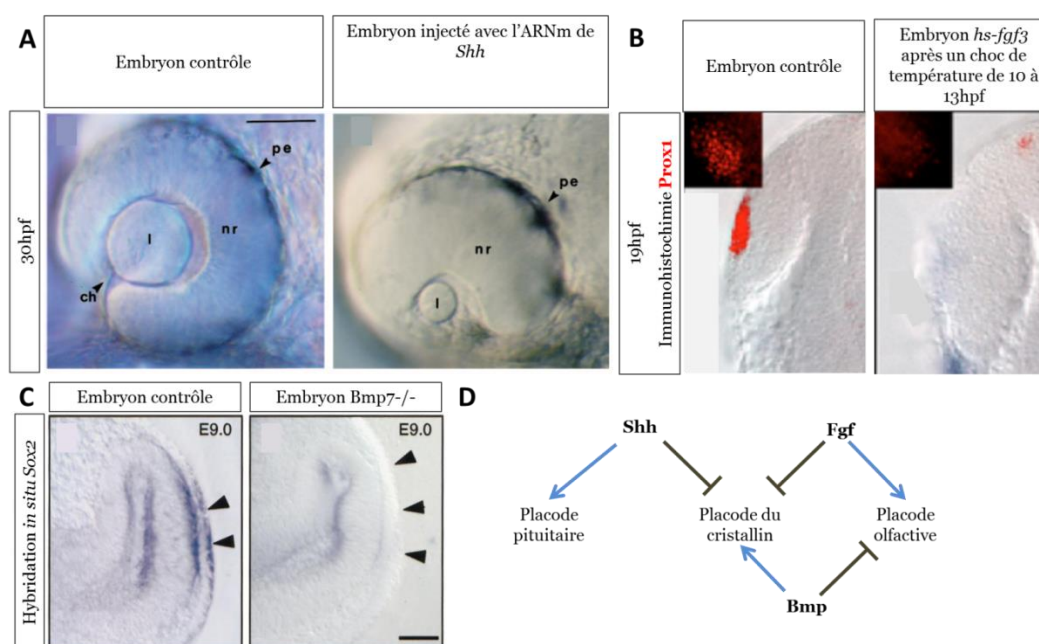


Figure 36 Rôles des différentes signalisations sur la régionalisation de la région panplacodale. **A** Photographies de l'œil d'embryon de poisson-zèbre de 30hpf, avec ou sans surexpression de Shh. **B** Immunohistochimie Prox1 (marqueur du cristallin) sur des embryons de poisson-zèbre de 19hpf, avec ou sans surexpression de Fgf3. **C** Hybridation *in situ* Sox2 sur des coupes d'embryons de souris à E9.0. Les flèches indiquent le territoire de la placode du cristallin, en face de la vésicule optique, qui n'exprime pas Sox2 chez les souris Bmp7^{-/-}. **D** Modèle de l'effet des signalisations Shh et Fgf sur les différentes placodes antérieures. D'après (Barth and Wilson, 1995; Grocott et al., 2012; Nechiporuk et al., 2007; Toro and Varga, 2007; Wawersik et al., 1999).

Comment ces différentes signalisations permettent-elles de définir l'identité des cellules du champ panplacodal ? Elles fournissent une information de position et régulent (directement ou non) l'expression des gènes au sein du champ panplacodal. Ainsi, dans la partie antérieure du champ, l'expression de *Pax6* est induite par les facteurs de transcription *Six1* et *Eya1/2* (exprimés dans tout le champ), alors que plus postérieurement, les signalisations *Fgf*, *Wnt*, *Tgfb* et *Pdgf* répriment son expression et induisent celle de *Pax3*. Les cellules du champ panplacodal antérieur initient en fait l'expression de *Pax6* grâce à des signaux neuropeptidiques : le mésendoderme antérieur sécrète la somatostatine, ce qui active l'expression de la nociceptine dans l'ectoderme antérieur, puis ces 2 peptides activent l'expression de *Pax6* (Lleras-Forero et al., 2013, **Fig 37**).

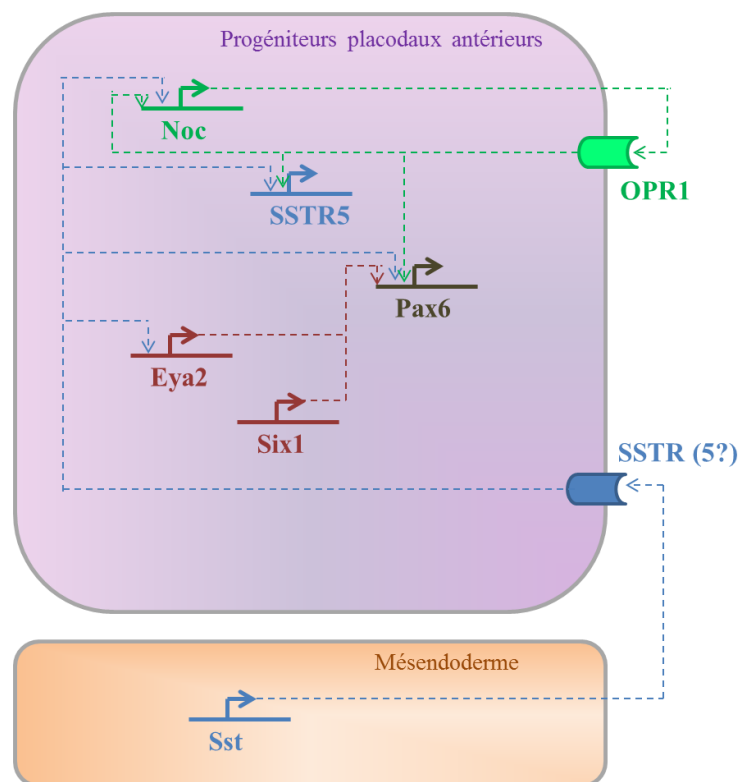


Figure 37 Modèle de l'initiation de l'expression de *Pax6* dans la région panplacodale. D'après des données obtenues chez le poulet. D'après (Lleras-Forero et al., 2013).

En début de somitogénèse, les cellules placodales expriment donc une combinaison différente de facteurs de transcription en fonction de leur position antéro-postérieure (**Fig 38**). A l'avant, les futures cellules du cristallin et de l'épithélium olfactif expriment *Pax6*, *Six3*, *Pitx3*, *Otx2*, *Dlx3b* et *Dlx4b*. Plus tard, la signalisation *Fgf* réprime *Pax6* dans le territoire olfactif, et l'expression de *Dlx3b* et *Dlx4b* ne se maintient pas dans le futur cristallin (Grocott et al., 2012). La placode du cristallin, quand elle se retrouve au contact de la vésicule optique, exprime également *Sox2*. *Pax6* et *Sox2* contrôlent l'expression des gènes en aval dans la différenciation du cristallin (Kondoh et al., 2004).

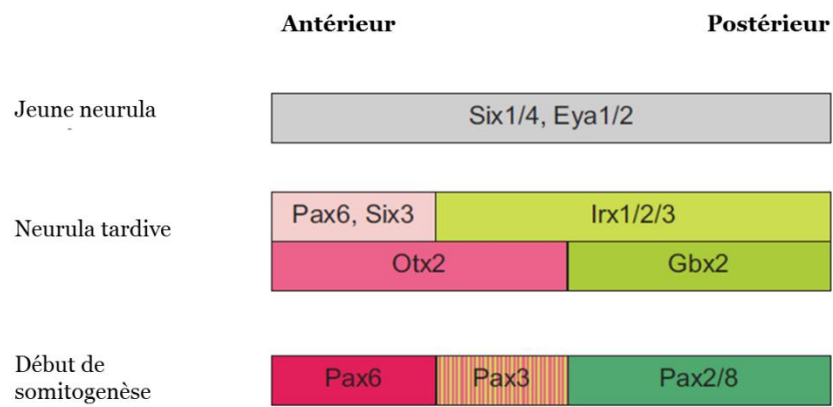


Figure 38 Régionalisation antéropostérieure de la région panplacodale. Modèle de l'expression de différents gènes dans le champ panplacodal au cours du développement. D'après (Streit, 2007).

III. Morphogenèse du cristallin

Les premières données sur la morphogenèse du cristallin ont été obtenues grâce à l'histologie (Fig 39). Elles ont montré que, chez le poisson-zèbre, les cellules « colonnaires » de l'ectoderme de surface couvrant les vésicules optiques s'épaississent et forment une placode à partir de 16hpf, et que cette placode s'invagine à partir de 20hpf. La masse du cristallin devient libre dans la cavité vitreuse à partir de 24 hpf (Li et al., 2000).

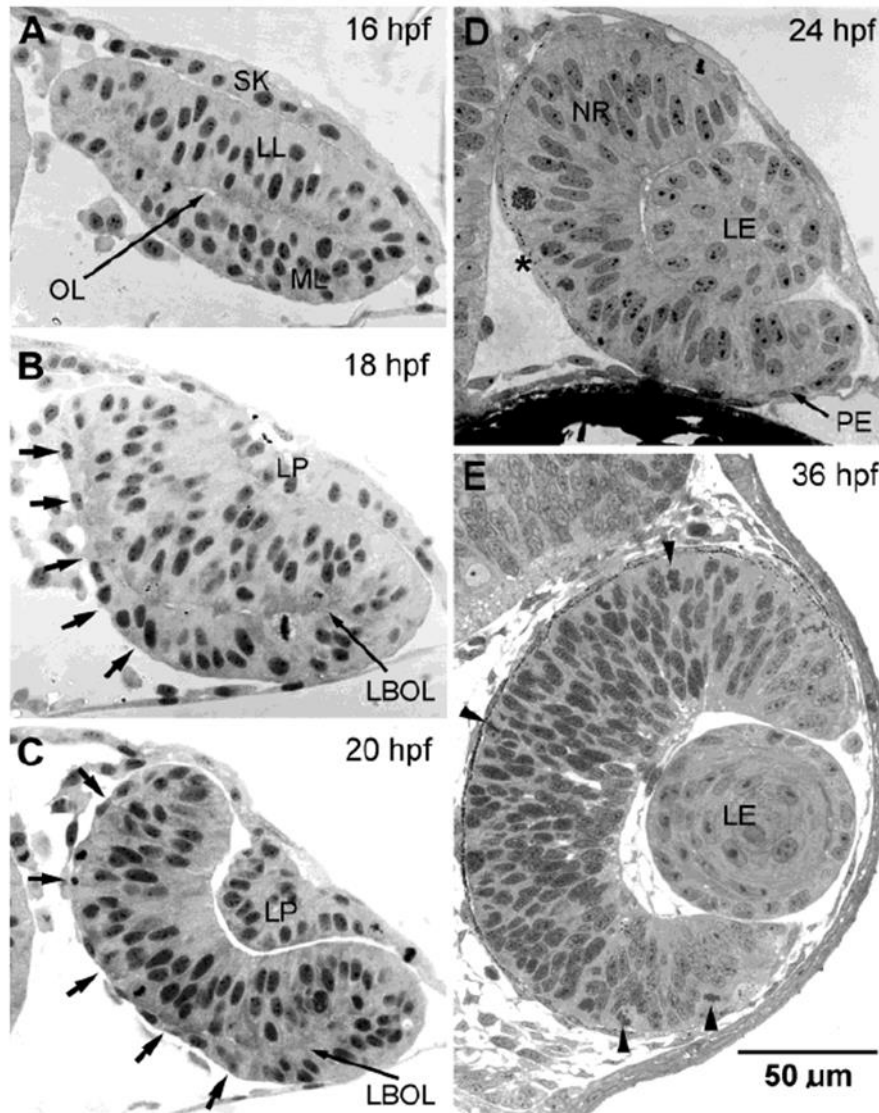


Figure 39 Morphogenèse du cristallin chez le poisson-zèbre de 16 à 36hpf. Sections à travers l'œil en formation, marquées au bleu de toluidine. Le cristallin se développe à partir d'un épithélium (SK), forme un épaissement au stade placode (LP), puis s'invagine pour former un cristallin mature (LE). D'après (Li et al., 2000).

Ces données ont été confirmées par des micrographies de microscopie électronique à transmission (Dahm et al., 2007). Elles montrent également des phénomènes d'apoptose vers 20-24hpf, qui pourraient participer au détachement de la masse du cristallin à partir de l'ectoderme de surface. Cette apoptose peut également être interprétée en fonction des réorganisations des cellules du futur épithélium du cristallin.

L'imagerie 4D d'embryons au cours de la morphogenèse de la coupe optique a permis de préciser les changements d'organisation cellulaire au sein du cristallin (**Fig 40A**).

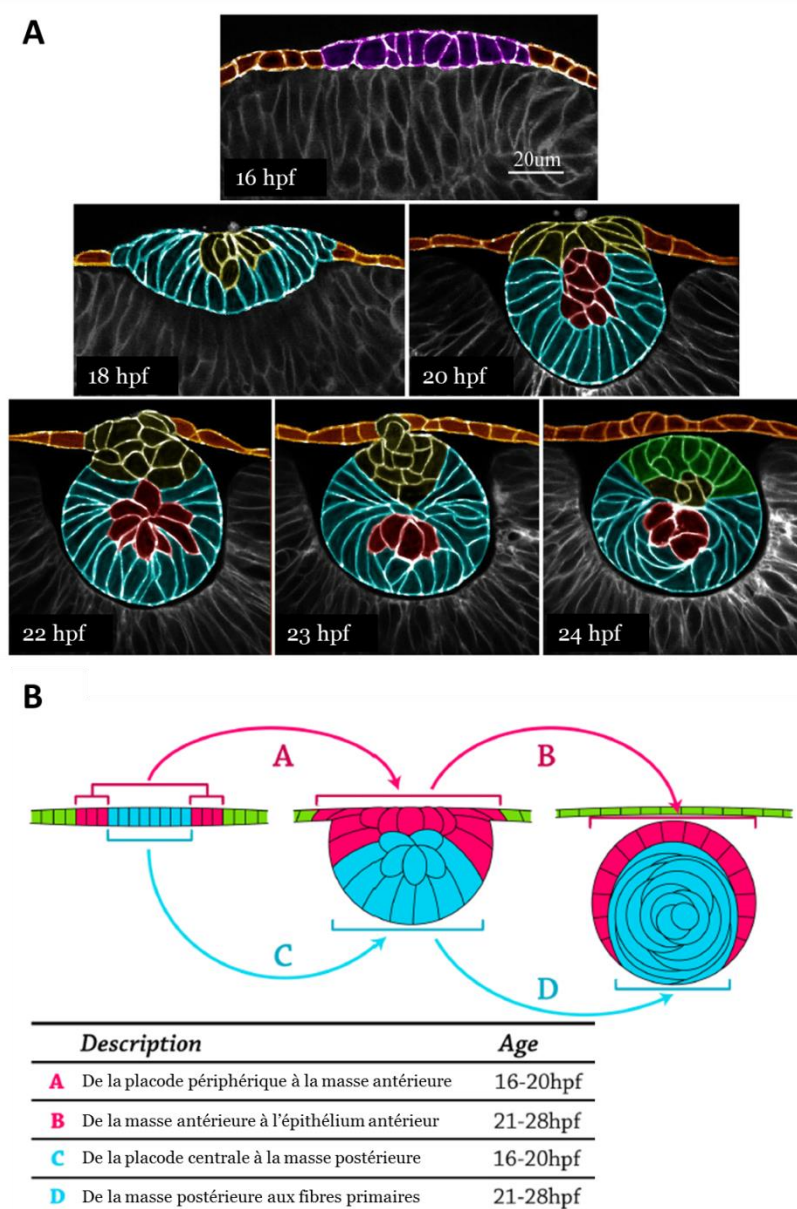


Figure 40 A Morphogenèse du cristallin chez le poisson-zébre de 16 à 36hpf. **B** Carte de devenir présomptif de la placode du cristallin chez le poisson-zébre. La placode du cristallin s'invagine sans former de vésicule. D'après (Greiling and Clark, 2009; Greiling et al., 2010).

De fait, la placode du cristallin commence à s'invaginer vers 17hpf chez le poisson-zèbre. Contrairement au cas des Mammifères, elle ne forme pas de vésicule mais une « masse cristalline » (Greiling and Clark, 2009). Dès 20hpf, trois morphologies cellulaires sont reconnaissables : les cellules les plus en surface (à la bordure distale du cristallin), représentant le futur épithélium du cristallin, sont aplaties et irrégulières ; les cellules les plus en profondeur (à la bordure proximale), futures fibres primaires du cristallin, s'allongent ; et les cellules au centre de la masse du cristallin, formant le noyau, sont ovoïdes.

Entre 20 et 24hpf, la tige qui relie le cristallin à l'ectoderme de surface s'affine de plus en plus. A 24hpf, la masse du cristallin est complètement détachée de l'ectoderme de surface, la future cornée, et se retrouve dans la cavité vitreuse (Greiling and Clark, 2009).

De manière intéressante, une autre étude d'imagerie *in vivo* de 16 à 28hpf a montré que les cellules donnant l'épithélium du cristallin et celles donnant les fibres étaient déjà dans 2 territoires distincts au stade placode : l'épithélium dérive de la partie périphérique de la placode, alors que les fibres dérivent de sa partie centrale (Greiling et al., 2010, **Fig 40B**). Il existe donc une régionalisation très précoce, dès le stade placode, des précurseurs des types cellulaires du cristallin.

Les cellules présomptives du cristallin qui, à 12hpf, recouvrent entièrement la vésicule optique, subissent 2 mouvements concomitants : un mouvement de « moulinet » entre 12 et 14hpf qui les fait progresser globalement vers l'avant, et un mouvement de compaction, de 12 à 24hpf, qui provoque leur rassemblement en une sphère. Le suivi des cellules du cristallin permet également de noter que les domaines antérieur et postérieur du cristallin sont délimités dès 12hpf (Kwan et al., 2011). Les auteurs suggèrent que ces deux compartiments correspondent à deux destinées cellulaires différentes (cellules fibreuses et épithéliales). Pourtant, à 24hpf, les cellules épithéliales occupent déjà leur position définitive, entourant la masse du cristallin, et sont d'après les études de Greiling, issues de la partie périphérique de la placode du cristallin (et pas de la partie antérieure).

IV. Différenciation du cristallin

a. Différenciation de l'épithélium du cristallin

Entre 23 et 28hpf, les cellules de la bordure distale se réorganisent en une seule couche cellulaire, par des phénomènes de migration et d'apoptose (Greiling and Clark, 2009, **Fig 41**).

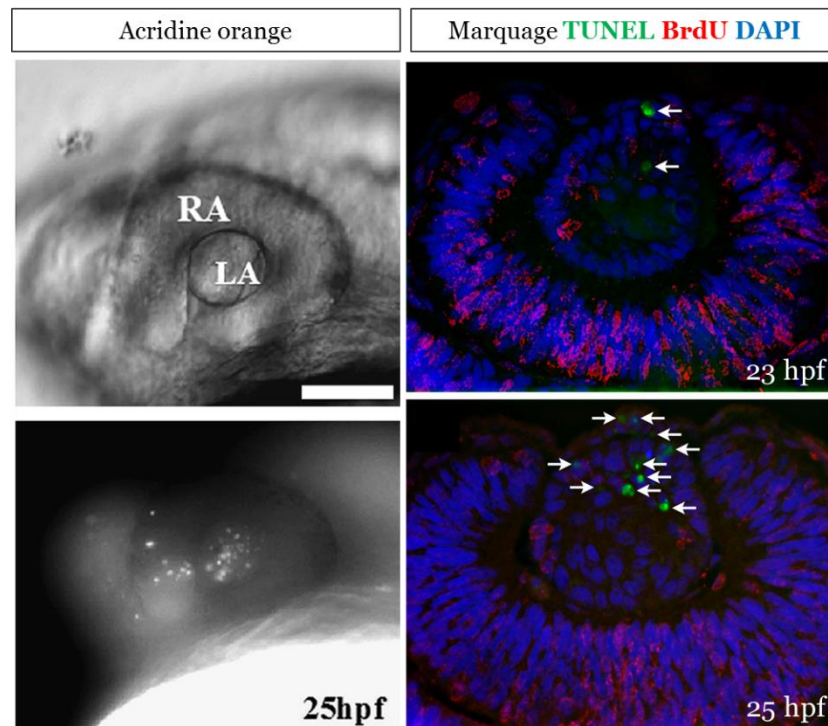


Figure 41 Apoptose dans le cristallin de poisson-zèbre à 23 et 25 hpf. A gauche, marquage acridine orange à 25hpf. A droite, marquage TUNEL (vert) sur sections d'œil à 23 et 25 hpf (les flèches indiquent les cellules apoptotiques). Les noyaux sont marqués par du DAPI. Le marquage rouge correspond à une immunohistochimie anti BrdU, qui a été incorporé pendant 1 à 3h avant la fixation. D'après (Dahm et al., 2007; Greiling et al., 2010).

La prolifération se réduit vers 67hpf à une zone légèrement plus proximale que l'équateur du cristallin, la zone germinative (Greiling et al., 2010). Les cellules formées par ces divisions se différencient en fibres secondaires du cristallin, dans la zone de transition (**Fig 42**). La plupart des autres cellules de l'épithélium du cristallin sont arrêtées au stage G0, en quiescence.

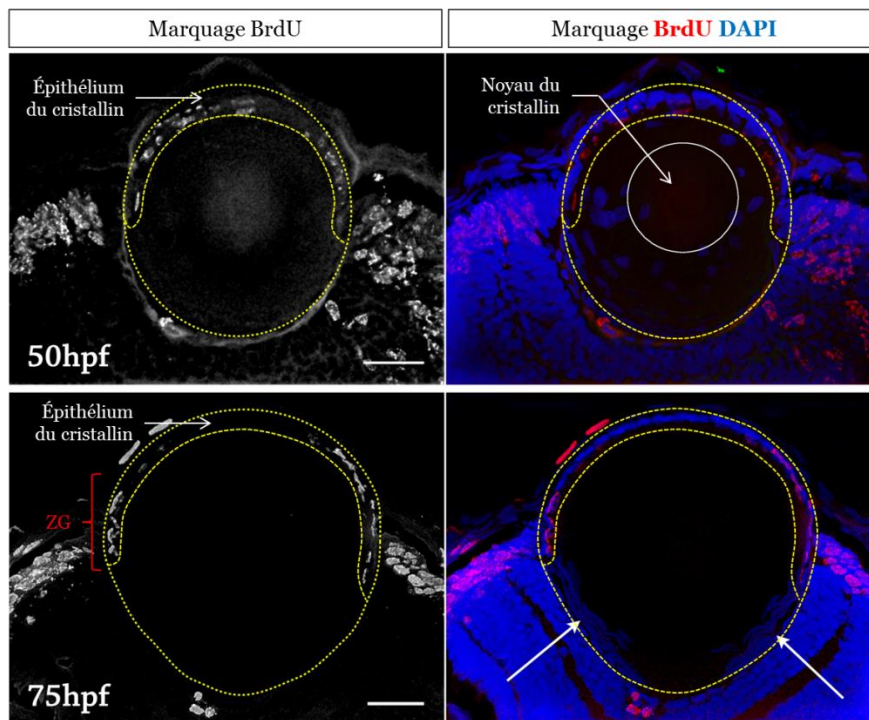


Figure 42 Incorporation BrdU et coupes de cristallin de poisson-zèbre à 50 et 75 hpf. L'épithélium dans son entier prolifère à 50 hpf, alors que seule la zone germinative, à l'équateur, prolifère encore à 75hpf. Le rond jaune délimite le cristallin. Le rond blanc délimite la partie centrale du cristallin, où les fibres n'ont pas de noyau. Les longues flèches à 75 hpf pointent la zone de transition, où les fibres du cristallin nouvellement formées ont encore leur noyau. ZG zone germinative. D'après (Greiling et al., 2010).

Chez les poissons, qui ont une croissance continue, l'œil et le cristallin grandissent tout au long de la vie. L'addition de nouvelles fibres secondaires se poursuit ainsi grâce à la division des cellules souches de la zone germinative, et de nouvelles cellules épithéliales sont formées grâce à quelques cellules épithéliales de la zone centrale qui continuent à se diviser (Vihtelic, 2008).

b. Différenciation des fibres du cristallin

Dès 18-20hpf, les fibres primaires du cristallin se différencient en s'allongeant et en s'enroulant de façon concentrique. Elles sortent du cycle cellulaire vers 21hpf (Greiling et al., 2010).

Les fibres secondaires du cristallin, formées plus tardivement à partir de 48 hpf au niveau de la zone germinative, migrent vers une zone de transition où elles s'allongent en direction des pôles du cristallin. Cette zone de transition de l'épithélium est reconnaissable à ses noyaux allongés. Lorsqu'elles ont atteint les pôles distal et proximal, elles forment des jonctions avec les fibres

voisines, créant ainsi une suture antérieure et postérieure (Greiling and Clark, 2012; Vihtelic, 2008). Les fibres matures mesurent environ 10µm de large mais moins d'1 µm d'épaisseur. A la jointure entre les fibres, la membrane forme des interdigitations (Dahm et al., 2007, **Fig 43**).

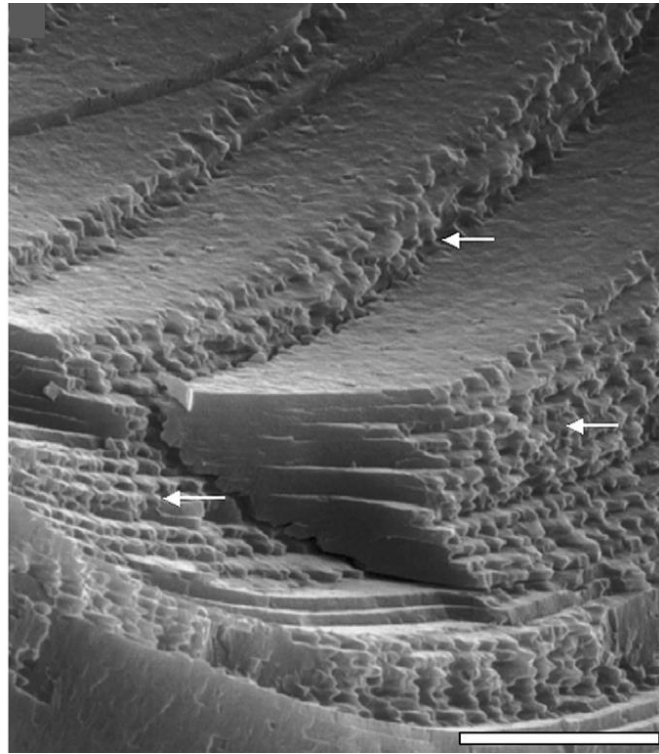


Figure 43 Microscopie électronique à balayage du cristallin après cryofracture chez le poisson-zèbre adulte. Les flèches pointent les replis de membrane sur la « tranche » des fibres du cristallin. D'après (Dahm et al., 2007).

Les fibres, aussi bien primaires que secondaires, perdent leurs organites (dont leur noyau) au cours de leur différenciation, ce qui permet leur transparence (Bassnett and Beebe, 1992). D'après des études chez la souris, le mécanisme de dégradation des organites pourrait s'apparenter à une forme d'apoptose modifiée, ou bien s'appuyer sur le système ubiquitine-protéasome de dégradation des protéines (Zandy and Bassnett, 2007). La perte des noyaux dans la partie centrale du cristallin se produit environ à 50hpf chez le poisson zèbre. Progressivement, en partant du centre, toutes les fibres du cristallin perdent leurs organites. A 72hpf, seules les fibres secondaires nouvellement différenciées ont encore leurs organites (Greiling et al., 2010, **Fig 44**). Le cristallin a atteint son organisation adulte : entouré d'une lame basale (la capsule), il est composé d'un cortex de cellules nucléées (l'épithélium et les fibres nouvellement formées) et d'un noyau constitué de fibres complètement différenciées. La larve est désormais capable de comportements liés à la vision (Vihtelic, 2008).

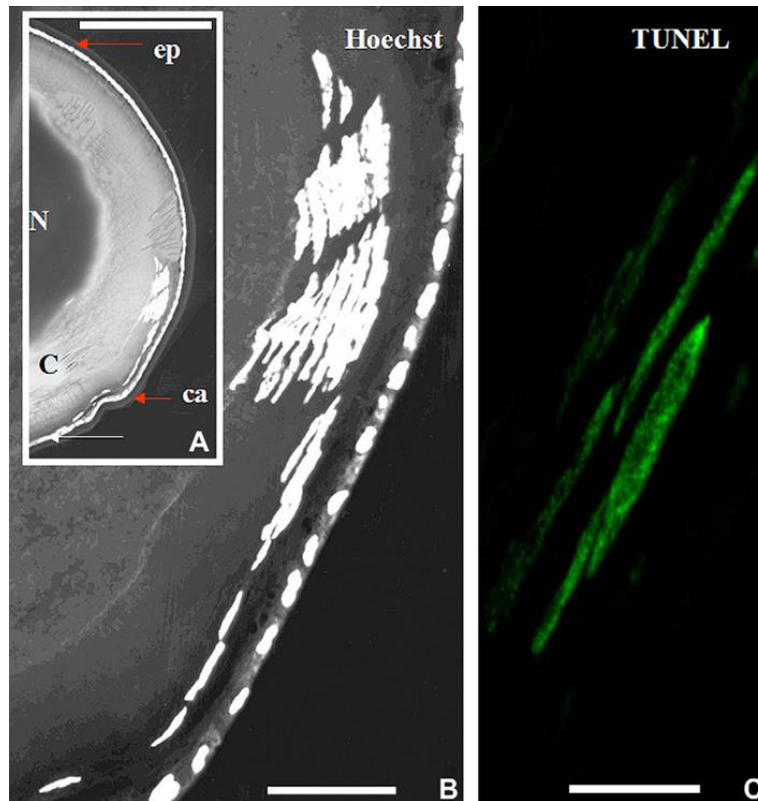


Figure 44 Perte des noyaux des fibres du cristallin dans la zone de transition, chez le poisson-zèbre adulte. **A** Vue globale d'une coupe de cristallin, montrant la capsule du cristallin (ca), le cortex (C), l'épithélium (ep), et le noyau (N) du cristallin. **B** Détail de la zone de transition avec un marquage Hoechst des noyaux, montrant qu'ils ne sont présents qu'en périphérie. **C** Marquage TUNEL dans la même zone, montrant la dégradation des noyaux dans les fibres nouvellement formées. D'après (Dahm et al., 2007).

c. Régulation de la différenciation du cristallin

1. Prox1

Le facteur de transcription Prox1, dont l'expression est régulée par Pax6 chez la souris (Ashery-Padan, 2000), a une importance majeure pour le développement du cristallin et plus particulièrement des fibres. Chez la Souris Prox1 KO, les cellules postérieures du cristallin ne s'allongent pas, ne sortent pas correctement du cycle cellulaire et entrent en apoptose (Wigle et al., 1999). Prox1 contrôlerait la sortie du cycle cellulaire, notamment en inhibant indirectement le couple CycE / Cdk2 qui régule la transition G1/S (Cvekl and Duncan, 2007).

Chez le poisson zèbre, il existe 2 paralogues, Prox1a et Prox1b. Prox1a est exprimé dès le stade placodal, et dans le cristallin au moins à partir de 20 hpf (Thisse and Thisse, 2005, **Fig 45**). Malheureusement, le cristallin des morphants *prox1a* n'a pas été étudié (Greiling and Clark, 2012).

Prox1b ne semble pas impliqué dans le développement du cristallin, mais plutôt dans celui du système lymphatique (Del Giacco et al., 2010).

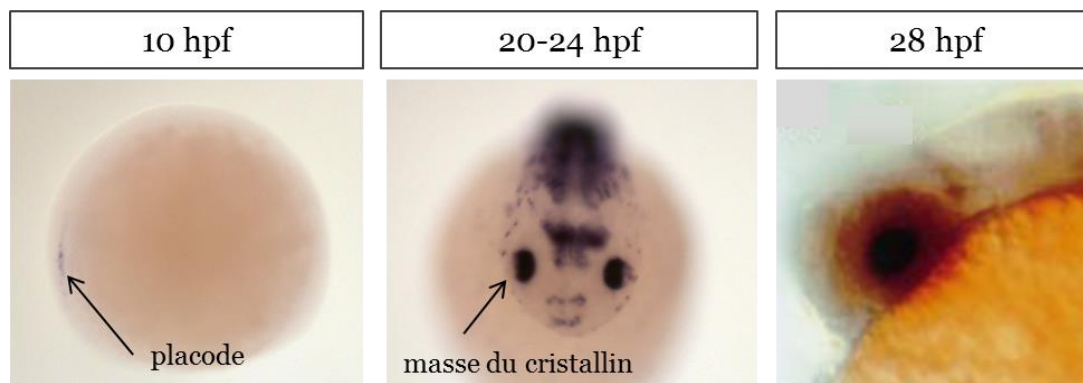


Figure 45 Expression de Prox1a chez le poisson-zèbre. Hybridations *in situ* à 10hpf (vue latérale) et 20-24hpf (vue dorsale), et immunohistochimie à 28hpf (vue latérale). D'après (Glasgow and Tomarev, 1998; Thisse and Thisse, 2005).

2. Les facteurs Maf

Chez la souris, le facteur de transcription c-Maf, qui est exprimé exclusivement dans les fibres du cristallin, a un rôle dans l'élongation des fibres primaires. Chez le poisson zèbre, il est probable que c-Maf et Maf-B, tous deux exprimés dans les fibres du cristallin dans cette espèce, assurent cette fonction de façon redondante (**Fig 46**). En effet, chez le mutant *mafB*, le développement du cristallin semble normal (Kajihara et al., 2001; Moens et al., 1998). Chez la souris, l'expression de ces facteurs de transcription dépendrait de la signalisation Fgf et de Pax6 (Cvekl and Duncan, 2007).

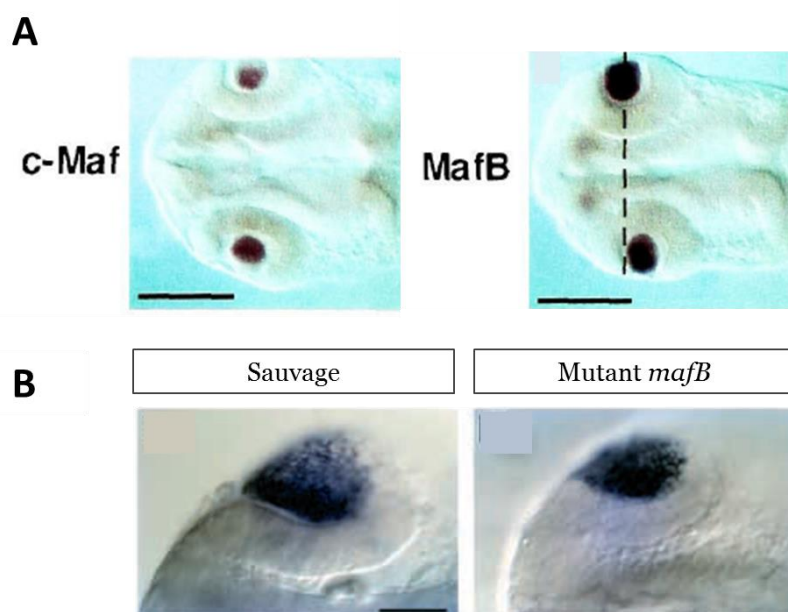


Figure 46 Expression de c-Maf et MafB chez le poisson-zèbre. **A** A 28hpf, c-Maf n'est exprimé que dans les fibres alors que MafB est aussi exprimé dans l'épithélium. **B** Expression de MafB chez un poisson-zèbre sauvage ou portant une mutation considérée comme nulle dans la séquence codante de MafB : le développement du cristallin ne semble pas affecté chez le mutant (contrairement à d'autres structures). D'après (Kajihara et al., 2001; Moens et al., 1998).

3. Pitx3

Chez le poisson zèbre, Pitx3 est exprimé dès la fin de la gastrulation au sein de la bordure de la plaque neurale dans les futures cellules du cristallin et de l'adénohypophyse, puis dans l'ectoderme présomptif du cristallin à 14hpf et dans le cristallin à 24hpf (**Fig 47A**). L'expression de Pitx3 dans l'adénohypophyse est spécifique du poisson zèbre (Dutta et al., 2005; Shi et al., 2005; Zilinski et al., 2005).

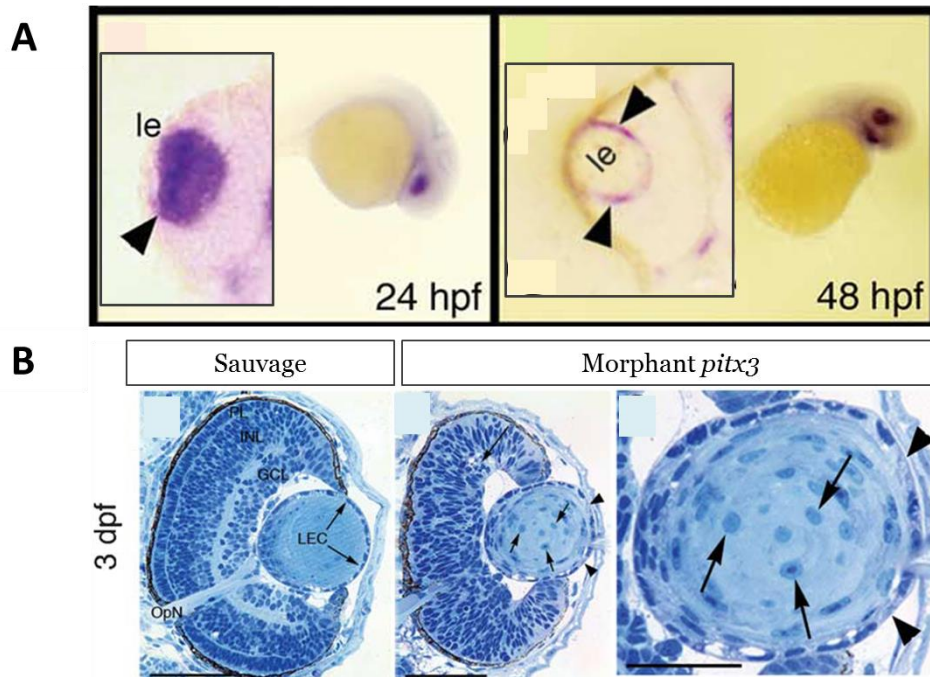


Figure 47 Expression et fonction de Pitx3 chez le poisson-zèbre. **A** A 24 hpf, Pitx3 est exprimé dans le cristallin (le) (pointe de flèche). A 48 hpf, son expression est restreinte à certaines fibres du cristallin, probablement dans la zone de transition. Les cadres de gauche sur chaque image montrent des coupes au stade correspondant. **B** Coupes à travers l'œil de larves de 3 dpf sauvages ou morphantes pour *pitx3*. Les flèches indiquent la rétention de noyaux dans les fibres du cristallin morphant. D'après (Shi et al., 2005).

Chez la souris, les mutants *pitx3* (*aphakia*) ont un cristallin qui ne s'invagine pas correctement (Grimm et al., 1998). Le rôle de Pitx3 dans l'invagination de la vésicule du cristallin semble avoir été perdu chez les poissons. En revanche, Pitx3, chez le poisson zèbre, semble réguler la différenciation des fibres du cristallin (**Fig 47B**). Ainsi, dès 48 hpf, l'expression de Pitx3 est réduite à une population de cellules proches de l'équateur du cristallin, probablement la zone de transition. Chez le morphant *pitx3*, les cellules épithéliales sont désorganisées et les fibres du cristallin ne s'allongent pas, conservent leur noyau et finissent par entrer en apoptose (vers 5-7 dpf) (Shi et al., 2005).

Chez la souris, Pitx3 est sous le contrôle de Pax6 : son niveau d'expression est réduit chez des mutants hétérozygotes pour Pax6 (Chauhan et al., 2002).

4. Foxe3

Un autre acteur important dans le développement du cristallin est Foxe3. La délétion ciblée de Foxe3 chez la souris provoque un défaut d'invagination de la vésicule du cristallin, une réduction de la prolifération des cellules épithéliales du cristallin, un défaut d'élongation et une rétention du noyau dans les fibres du cristallin. De manière intéressante, chez ce mutant, l'expression de Prox1 est réduite. Foxe3 doit donc réguler l'expression de Prox1 (Medina-Martinez et al., 2005).

Chez le poisson zèbre, l'expression de Foxe3 semble restreinte à l'épithélium du cristallin mais une expression beaucoup plus faible est détectée dans les fibres secondaires en voie de différenciation (Shi et al., 2006, **Fig 48A**).

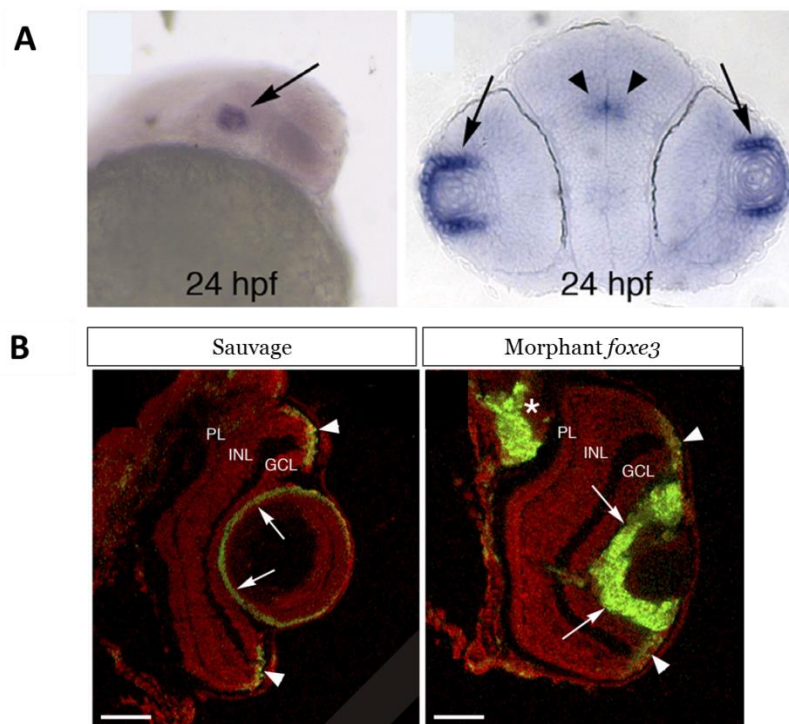


Figure 48 Expression et fonction de Foxe3 chez le poisson-zèbre. **A** A 24hpf, Foxe3 est exprimé dans le cristallin, et plus fortement dans l'épithélium (flèche) que dans les fibres. **B** Marquage PCNA sur des coupes de cristallin morphant ou contrôle à 5dpf : la prolifération est augmentée chez le morphant. D'après (Shi et al., 2006).

Le morphant *foxe3* a été étudié : à 72 hpf, l'épithélium du cristallin est désorganisé et en plusieurs couches (**Fig 48B**). A 5 dpf, le cristallin est constitué uniquement de cellules nucléées, et le nombre de

cellules en mitose est augmenté. Ce dernier phénotype est l'inverse de celui observé chez les souris mutantes chez qui la prolifération est diminuée. Chez le poisson zèbre morphant, la différenciation des fibres est affectée également : certaines fibres gardent leur noyau à 3 dpf et le patron d'expression de *cryaa* est altéré (Shi et al., 2006).

L'expression de Foxe3 est dépendante de Pax6 : son expression est perdue chez des souris homozygotes mutantes pour Pax6 (*small eye*), et elle est réduite chez les hétérozygotes (Blixt et al., 2007).

D'autre part, les patrons d'expression de Foxe3 et Pitx3 se superposent, à 5 dpf en tous cas. Et chez le morphant *pitx3*, l'expression de *foxe3* est notablement réduite. Pitx3 semble donc réguler positivement l'expression de Foxe3 (Shi et al., 2006).

d. Les cristallines

Les cellules fibres du cristallin accumulent des protéines cytoplasmiques solubles appelées cristallines qui s'organisent spatialement sans s'agréger, créant ainsi une transparence semblable à celle du verre. Leur concentration atteint chez l'homme 450 mg/mL, probablement l'une des concentrations les plus élevées dans une cellule (Fagerholm et al., 1981). Elles ont souvent un rôle de chaperonne en plus de leur rôle structural. Le terme cristalline pour désigner une protéine du cristallin donnée est arbitraire, elles ne sont pas toutes phylogénétiquement liées et présentent des domaines protéiques fonctionnels variés.

Les études sur les cristallines sont pour l'instant loin d'être exhaustives : les données sur leur expression sont limitées, et celles sur leur fonction encore plus.

Les cristallines sont classées en 3 grandes familles en fonction de leur séparation par chromatographie à exclusion de taille : α (qui forment généralement des agrégats de nombreuses protéines), β (qui s'assemblent en octomères, tétramères ou dimères) et γ (généralement monomériques) (Greiling and Clark, 2012, **Fig 49**).

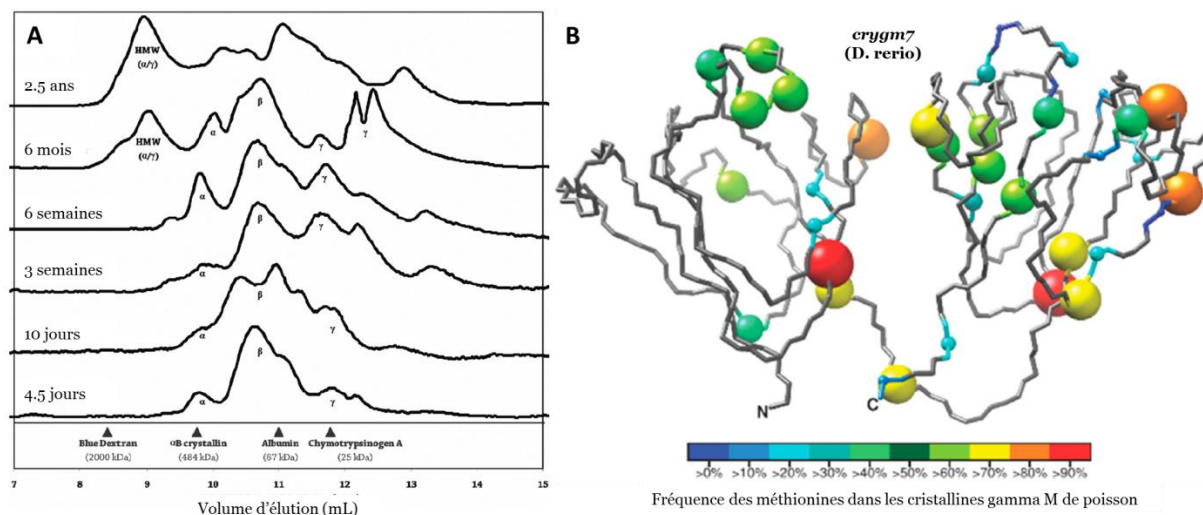


Figure 49 **A** Chromatographie par exclusion de taille du protéome du cristallin de poisson-zèbre. **B** Structure 3D d'un monomère de *crygm7* de poisson zèbre, avec une organisation en 2 domaines typique pour les cristallines gamma. Des résidus méthionine sont régulièrement espacés en surface de la protéine, et pourraient expliquer en partie les interactions entre cristallines gamma à forte densité. D'après (Greiling et al., 2009; Mahler et al., 2013).

Les cristallins de poissons contiennent plus de cristallines γ et moins de cristallines α que les cristallins de Mammifères (Vihtelic, 2008).

Comme les fibres du cristallin perdent leur noyau pendant la différenciation, très peu de synthèse protéique se produit dans ces cellules (Young and Fulhorst, 1966), et les cristallines sont très peu renouvelées. Certaines accumulent avec l'âge des régulations post-traductionnelles qui compromettent leur fonction : elles sont par exemple clivées par des protéases, les calpaïnes, et deviendraient insolubles une fois tronquées. Ce mécanisme expliquerait en partie l'apparition des cataractes (Posner et al., 2008; Ueda et al., 2002).

1. Les cristallines α

Les cristallines α appartiennent à la même superfamille que les petites protéines de choc thermique (*hsp*) (de Jong et al., 1993). Elles ont un rôle de protection contre le stress cellulaire, notamment par leur fonction de chaperonne. Chez les Mammifères, 2 cristallines α existent : αA et αB . La cristalline αA est présente en quantité plus importante chez l'Homme et est spécifique du cristallin, contrairement à αB . Chez plusieurs espèces dont le poisson zèbre, la concentration des cristallines α augmente avec l'âge. Leur expression augmente en réponse à des conditions de stress variées, comme une augmentation de température (Greiling and Clark, 2012).

La cristalline αA du poisson zèbre (aussi appelée *hspb4*) est d'abord exprimée de manière ubiquitaire vers 14hpf. A 24hpf, son expression n'est pas détectée par hybridation *in situ*, mais en cas de choc thermique, elle s'exprime uniquement dans le cristallin (**Fig 50A-B**). A partir de 29hpf, elle s'exprimerait spécifiquement dans le cristallin (Kurita et al., 2003; Marvin et al., 2008). Chez le poisson adulte, des niveaux faibles sont détectés dans le foie et la rate.

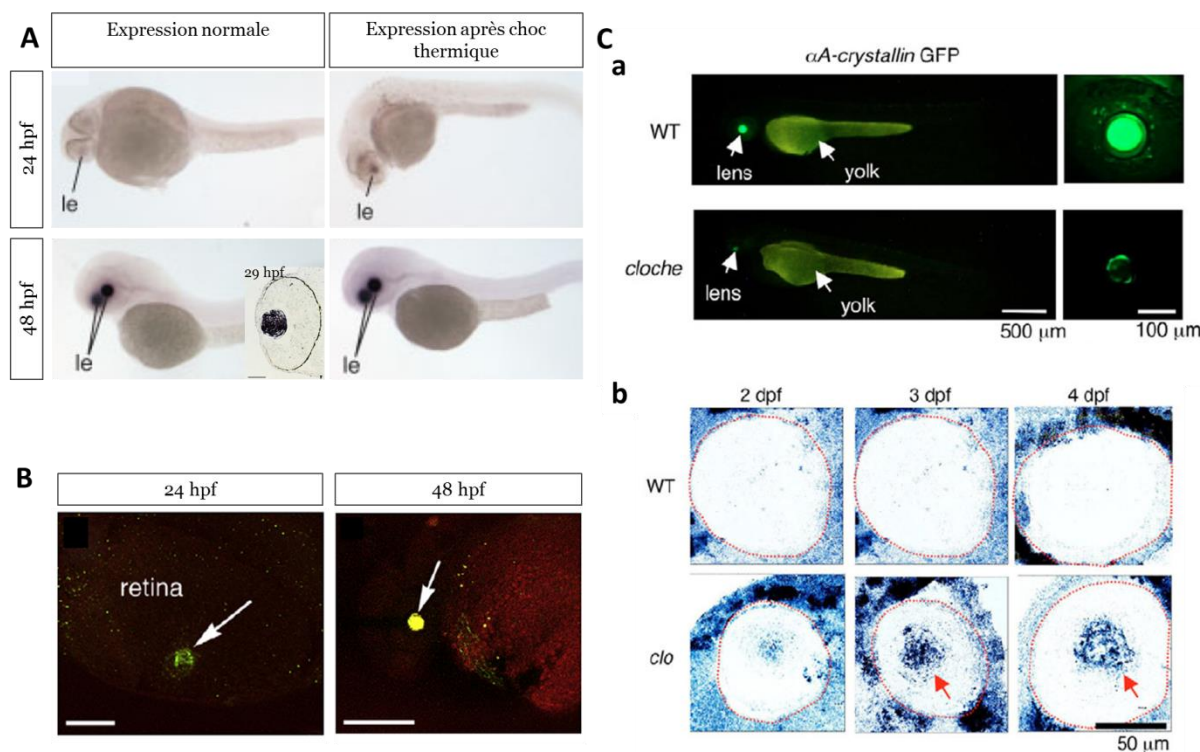


Figure 50 Expression et fonction de *cryaa* chez le poisson-zèbre. **A** Hybridations *in situ* en conditions normales ou après 1h de choc thermique à 37 °C. le : cristallin. **B** Immunohistochimie à 24 et 48 hpf. **C** Phénotype du mutant *cloche* de poisson-zèbre. a) Le mutant *cloche* a des niveaux d'expression de *cryaa* réduits, et un cristallin plus petit que le contrôle. b) Le mutant *cloche* développe une cataracte. Images au microscope confocal de cristallins mutants ou contrôles : les zones sombres pointées par les flèches sont des régions qui reflètent la lumière au lieu de la transmettre. D'après (Goishi, 2006; Harding et al., 2008; Kurita et al., 2003; Marvin et al., 2008).

D'un point de vue fonctionnel, la cristalline αA a une activité de chaperonne apparemment importante pour solubiliser d'autres protéines du cristallin, et des mutations dans sa séquence peuvent mener à des cataractes chez l'Homme (Litt, 1998; Mackay et al., 2003). Chez le poisson zèbre, le mutant *cloche* (une mutation inconnue apparue spontanément et retrouvée indépendamment par mutagenèse chimique) qui a des niveaux très réduits de *cryaa* développe une cataracte, liée à l'agrégation d'une autre cristalline (*crygm2d1*), dès 2.5 dpf (**Fig 50C-D**). La surexpression de *cryaa* chez ce mutant permet la solubilisation de la cristalline gamma, et restaure donc la transparence (Goishi, 2006), ce qui illustre bien la fonction chaperonne de cette cristalline. Cependant, la répression

de l'expression de *cryaa* par morpholino chez le poisson zèbre n'affecte pas le développement du cristallin, au moins pendant les 4 premiers jours de développement (Posner et al., 2013). Il est donc probable que, chez le mutant *cloche*, l'expression faible de *cryaa* n'est pas le seul défaut du mutant, et que d'autres éléments provoquent l'apparition d'une cataracte.

Deux paralogues de la cristalline α B existent chez le poisson zèbre, *cryaba* et *cryabb*. Leur similarité de séquence avec l'homologue chez l'Homme est assez faible (60%), et, entre elles, la similarité est encore plus faible (50%). Ces deux cristallines ont une activité chaperonne, *cryabb* étant plus efficace dans ce rôle (Greiling and Clark, 2012; Smith et al., 2006).

Ces cristallines α B ne sont pas exprimées précocement chez le poisson-zèbre : leur expression jusqu'à 48 hpf n'est pas détectée par hybridation *in situ* (Marvin et al., 2008). Pourtant, par immunohistochimie, la protéine *cryaba* est détectée à 24, 48 et 72 hpf (**Fig 51**). Son expression est alors très large dans le système nerveux antérieur et le cristallin (Harding et al., 2008). Chez l'adulte, *cryaba*, au contraire, est spécifique du cristallin (Posner et al., 1999). L'expression de *cryabb* n'est pas restreinte au cristallin chez l'adulte (Smith et al., 2006).

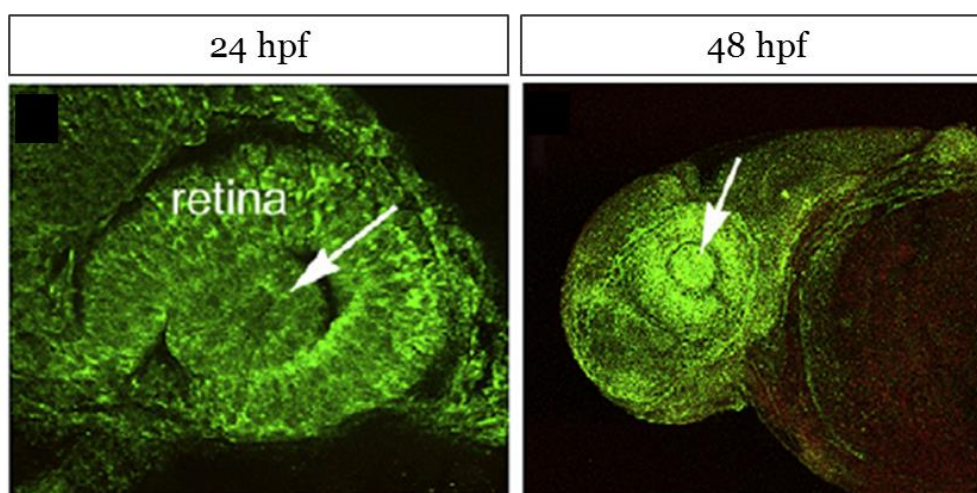


Figure 51 Expression de la cristalline α Ba de poisson-zèbre. Immunohistochimie à 24 et 48hpf de la cristalline *cryaba*. D'après (Harding et al., 2008).

La régulation des cristallines α a été étudiée chez la souris. Le facteur de transcription qui semble le plus important dans la régulation de ces cristallines est c-Maf, qui est exprimé exclusivement dans les fibres du cristallin. Mais Pax6 aurait également un rôle dans l'induction d'un niveau basal d'expression de ces cristallines, notamment pour *cryab* (Cvekl and Duncan, 2007).

2. Les cristallines β

Les cristallines β et γ partagent un domaine $\beta\gamma$ constitué de feuillets β antiparallèles. Elles sont liées phylogénétiquement à des protéines de réponse au stress, telles que *aim* (absent in melanoma) (Wistow et al., 2005). Les cristallines γ comportent 2 domaines $\beta\gamma$ qui permettent des interactions intramoléculaires. Les cristallines β , elles, comportent deux domaines $\beta\gamma$ trop proches pour pouvoir interagir ensemble, et ils permettent donc des interactions intermoléculaires (Greiling and Clark, 2012).

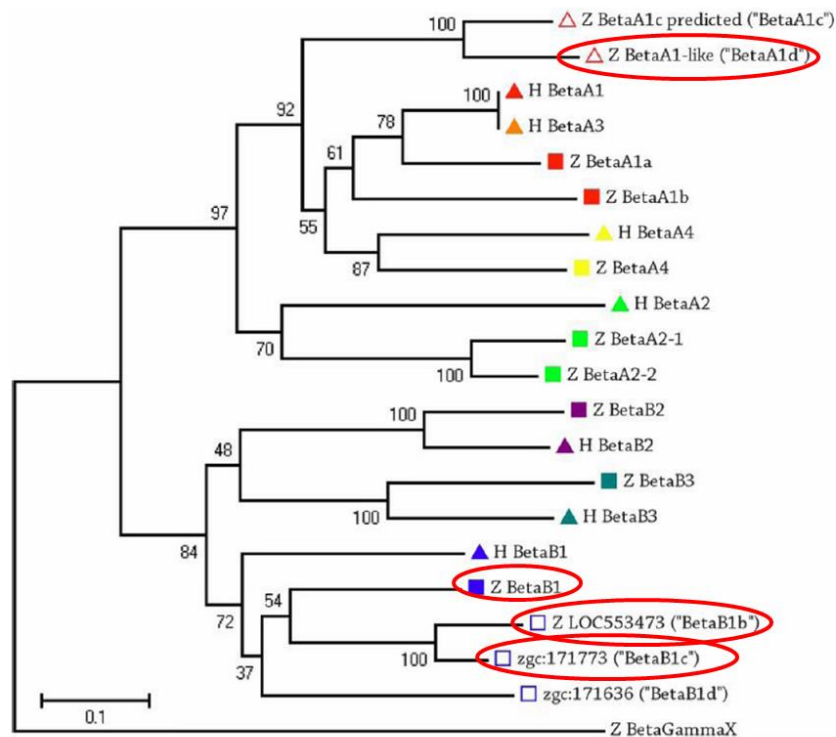
Les cristallines β forment une famille d'au moins 6 membres chez tous les Vertébrés étudiés jusqu'ici : $\beta A1/3$, $\beta A2$, $\beta A4$, $\beta B1$, $\beta B2$, $\beta B3$. Il en existe 13 chez le poisson zèbre : 4 orthologues de $\beta A1$ ($\beta A1a-d$), 2 orthologues de $\beta A2$ (-1 et -2), $\beta A4$, 4 orthologues de $\beta B1$ (a-d), $\beta B2$ et $\beta B3$ (Greiling et al., 2009, **Fig 52A**).

Parmi celles-ci, *crybb1* et *cryba2b* sont, dans l'état actuel des connaissances, les β -cristallines exprimées le plus tôt dans la masse du cristallin, à 20hpf seulement (Chen et al., 2001; Wang et al., 2008, **Fig 52B-C**). *Cryba1b* est détectée à partir de 24 hpf dans le cristallin (Wang et al., 2008).

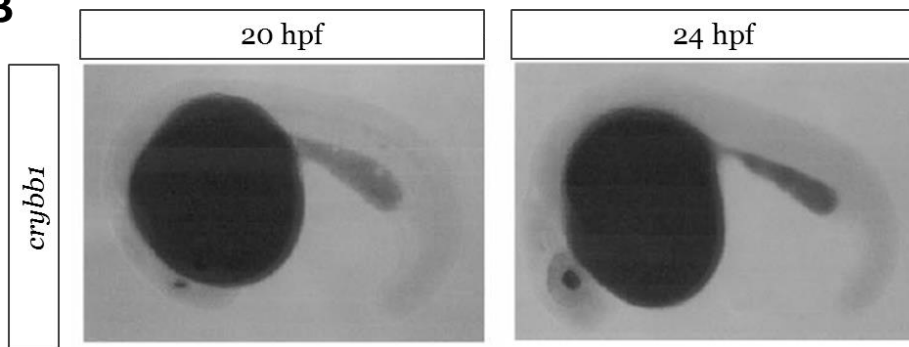
Chez le Xénope, d'après des expériences de surexpression des facteurs de transcription MafB et L-Maf, ces facteurs contrôlent l'expression de la cristalline $\beta A4$ (Ishibashi and Yasuda, 2001). L'analyse d'une puce ADN chez un morphant *pitx3* a montré que la cristalline $\beta B1$ est une cible transcriptionnelle directe de Pitx3. Les cristallines $\beta A4$, $\beta B1$ et $\beta B3$ seraient également probablement régulées par Pitx3, même si leurs variations d'expression chez ce morphant sont moins spectaculaires (Hooker et al., 2012).

Chez la souris, ce sont les facteurs Maf et Prox1 qui régulent l'expression de *crybb1* (Cvekl and Duncan, 2007).

A



B



C

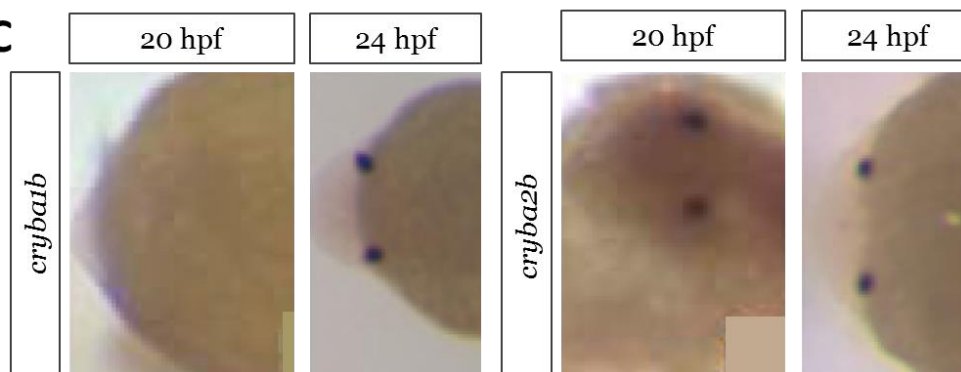


Figure 52 Phylogénie et expression des cristallines β de poisson-zèbre. **A** Arbre des cristallines β de poisson-zèbre et d'Homme. Les couleurs des symboles indiquent l'orthologie, leur forme l'espèce (triangle pour homme, carré pour poisson-zèbre, sauf pour betaA1c et betaA1d). Les cristallines entourées de rouge sont celles, parmi les cristallines β , qui sont les plus abondantes à 4.5 dpf. **B** Hybridation *in situ* *crybb1* à 20 et 24 hpf chez le poisson-zèbre. **C** Hybridations *in situ* *cryba1b* et *cryba2b* à 20 et 24 hpf chez le poisson-zèbre. D'après (Chen et al., 2001; Greiling et al., 2009; Wang et al., 2008).

3. Les cristallines γ

Les cristallines γ sont abondantes dans les cristallins « durs » comme ceux des poissons et des rongeurs, mais sont quasi-absentes des cristallins « mous » des oiseaux (Greiling and Clark, 2012). Chez les mammifères, il existe 8 gènes de cristallines γ : -A, -B, -C, -D, -E, -F, -N, -S.

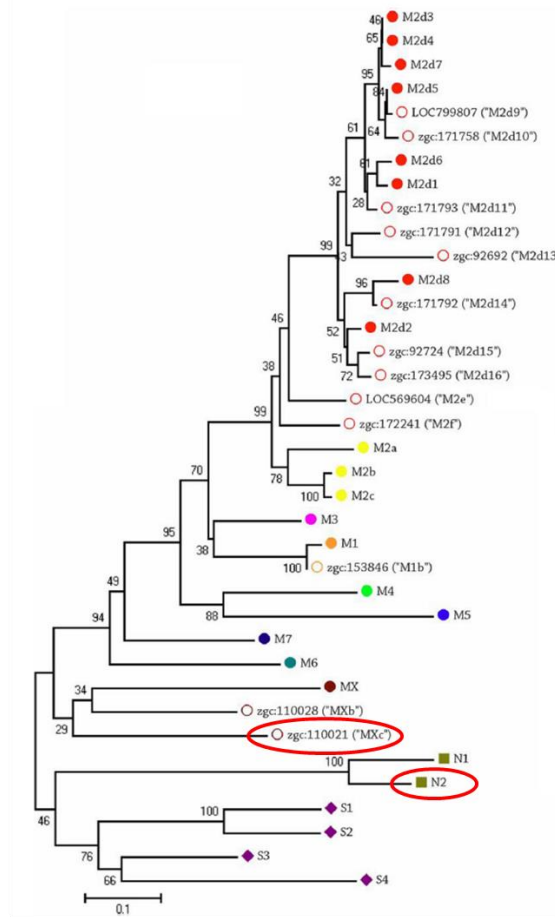
Les gènes γ A-F (le groupe « terrestre ») n'ont pas d'orthologues chez les poissons. En revanche, ceux-ci ont une classe unique de cristallines, les cristallines γ M, comptant 31 membres (le groupe « aquatique ») (**Fig 53A**). Ils ont 2 orthologues de cristallines γ N (1-2) et 4 orthologues de cristallines γ S (1-4). Un autre gène, $\text{cry}\beta\gamma\text{X}$, ressemble aux cristallines γ N mais présente un long domaine N-terminal comme les cristallines β .

La famille γ de cristallines compte donc au moins 37 membres chez le poisson zèbre, laissant supposer une forte fréquence de duplications géniques au cours de l'évolution dans cette famille. D'ailleurs, 30 des gènes de cristallines γ M sont situés dans la même région du chromosome 9, ce qui suggère un phénomène intensif de duplications en tandem (Greiling et al., 2009).

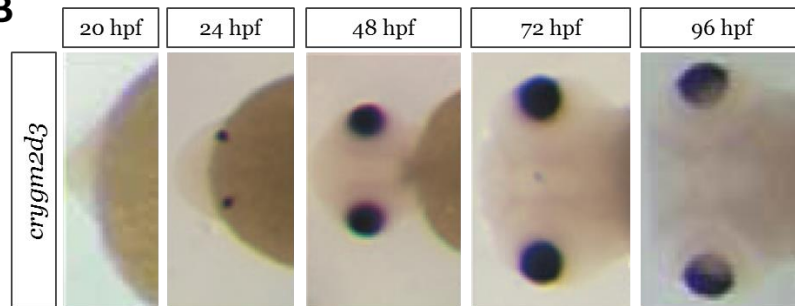
La cristalline γ dont l'expression a été détectée le plus tôt est *crygm2d3*, à 24hpf (Wang et al., 2008, **Fig 53B**). Cependant, l'anticorps ZI-1, qui est supposé détecter une γ -cristalline, marque le cristallin dès 20hpf (Greiling et al., 2010, **Fig 53C**).

D'après des expériences de surexpression en calotte animale de Xénope, l'expression des cristallines γ , comme certaines β , serait sous le contrôle des facteurs de transcription Maf (Ishibashi and Yasuda, 2001). Chez la souris, l'étude du promoteur de *crygf* suggère que Pax6, Six3 et c-Maf sont impliqués dans sa régulation (Cvekl and Duncan, 2007). De plus, un ensemble de cristallines (dont des cristallines γ) forment un groupe de synexpression : leur expression varie de manière corrélée dans différentes souches sauvages de souris (*Cryaa*, *Cryab*, *Cryba1*, *Cryba2*, *Cryba4*, *Crybb1*, *Crybb2*, *Crybb3*, *Crygb*, *Crygc*, *Crygd*, *Crygn*, and *Crygs*). De fait, elles ont dans leurs séquences régulatrices un enrichissement en sites de fixation du facteur MafA (Templeton et al., 2013). Enfin, cette étude montre, par immunoprécipitation de chromatine sur une lignée de cellules de cristallin, que MafA se fixe en amont des gènes de *cryga* et *crygd*. Chez la souris aussi, Maf aurait donc un rôle dans la régulation de l'expression des γ -cristallines.

A



B



C

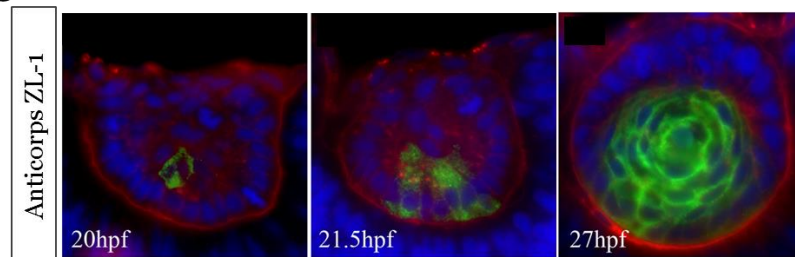


Figure 53 Phylogénie et expression des cristallines γ de poisson-zèbre. **A** Arbre des cristallines γ de poisson-zèbre. Les cristallines entourées de rouge sont celles, parmi les cristallines γ , qui sont les plus abondantes à 4.5dpf. Les couleurs des symboles indiquent l'orthologie. **B** Hybridation *in situ* *crygm2d3* chez le poisson-zèbre de 20 à 96 hpf. **C** Immunohistochimie sur coupe de cristallin avec l'anticorps ZL-1 qui détecte une cristalline γ non identifiée. Le marquage ZL-1 apparaît en vert, les membranes sont contre-colorées en rouge, et les noyaux sont marqués au DAPI. D'après (Greiling et al., 2009, 2010; Wang et al., 2008).

Chez la souris *Prox1*^{-/-}, l'expression des cristallines γ est réduite par rapport au sauvage (ce qui n'est pas le cas pour les cristallines α et β) : le facteur de transcription *Prox1* doit donc induire, directement ou non, l'expression des cristallines γ (Wigle et al., 1999).

D'autre part, les cristallines γ A et γ B seraient probablement régulées par *Pitx3* chez le Xénope, d'après l'analyse d'une puce ADN chez un morphant *pitx3* (Hooker et al., 2012).

En résumé, l'expression des cristallines semble régulée principalement par les facteurs de transcription Maf, *Prox1*, *Pitx3*, mais aussi *Pax6* et *Sox1* (Cvekl and Duncan, 2007, **Fig 54**), tous ces gènes étant impliqués dans le développement du cristallin et des fibres (voir section B IV c).

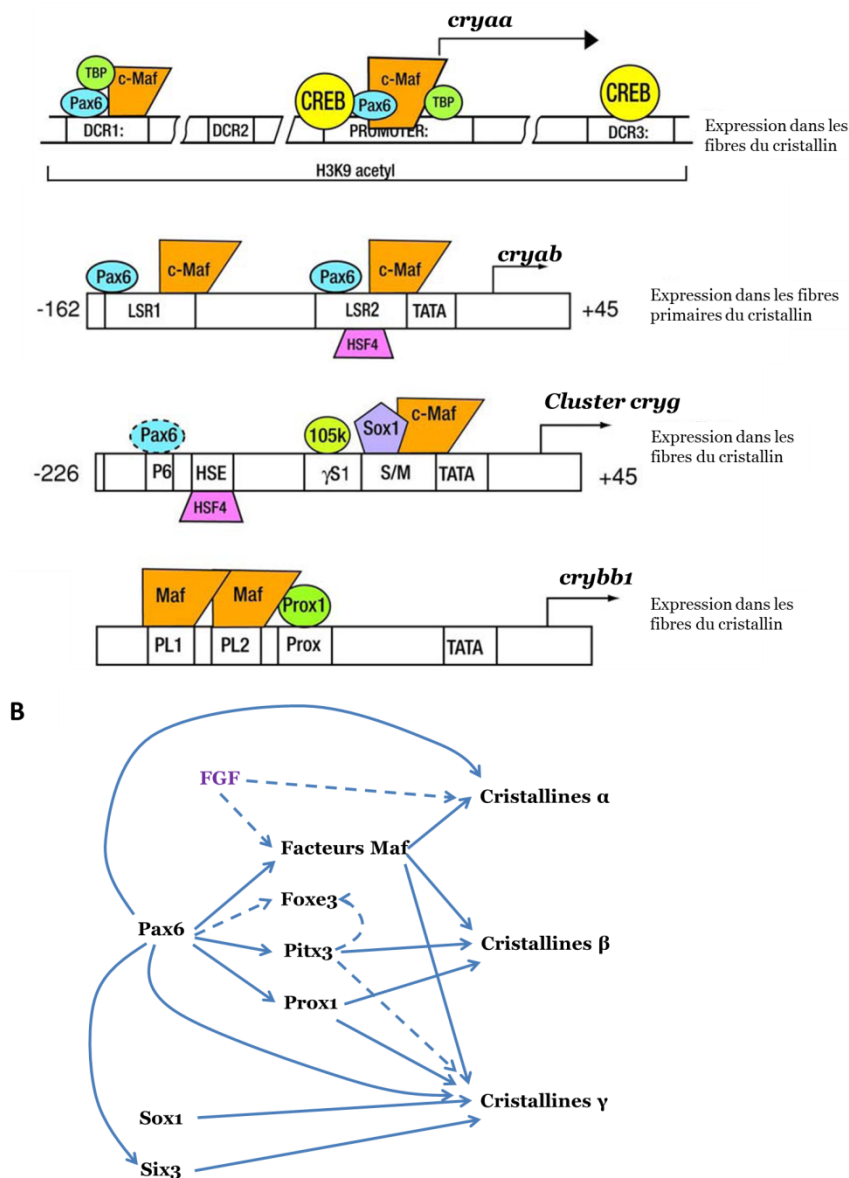


Figure 54 Régulation des cristallines. **A** Schéma des séquences régulatrices de plusieurs cristallines chez la souris. **B** Modèle de régulation des cristallines d'après les données de différentes espèces. Les flèches pleines indiquent une régulation directe. D'après (Cvekl and Duncan, 2007).

4. Autres cristallines

D'autres cristallines sont spécifiques de certains taxons. Elles correspondent en fait à des gènes ayant une fonction, souvent métabolique, chez tous les Vertébrés, et qui « gagnent » une expression dans le cristallin dans un taxon particulier, où elles acquièrent le rôle de cristallines. Ce processus a été appelé “partage de gènes” (Piatigorsky, 2003). Il s'applique d'ailleurs très bien aussi au cas des cristallines α , qui sont au départ des protéines de choc thermique.

Ainsi, la cristalline δ , phylogénétiquement liée à l'arginosuccinate lyase, est spécifique du groupe reptiles - oiseaux. La cristalline ε chez les crocodiles et certains oiseaux est proche d'une lactate déshydrogénase. La cristalline ζ , proche de la NADPH quinone oxydoréductase, ne serait présente que chez certains Mammifères. La cristalline τ , proche de l'énolase α , serait spécifique des canards, des tortues et des lamproies. Chez le poisson zèbre, des protéines non classiques ont été découvertes dans le cristallin et pourraient être considérées comme des cristallines : par exemple Griffin (galectin-related interfiber protein) qui est aussi une cristalline de souris, et Scinla (scinderin-like protein a), qui est exprimée à des niveaux plus élevés dans la cornée que dans le cristallin (Greiling and Clark, 2012).

La lengsine, de la famille des glutamine synthétases, est également accumulée dans le cristallin humain et celui de poisson zèbre. Son expression a été détectée à partir de 24hpf, et elle est réduite à partir de 72hpf à une population de fibres secondaires adjacentes aux cellules épithéliales. Chez l'adulte, la protéine est concentrée aux marges latérales des fibres secondaires, suggérant une interaction avec le cytosquelette. Le poisson zèbre morphant pour la lengsine a de fait des fibres du cristallin qui présentent des défauts d'élongation et de contacts intercellulaires (Harding et al., 2008).

V. Interaction entre composantes de l'œil

a. Dépendance du développement du cristallin à d'autres tissus

Le rôle de la rétine dans l'induction et le maintien du cristallin est supposé depuis longtemps. Un modèle longtemps accepté était celui selon lequel la placode du cristallin était induite à partir de l'ectoderme de surface par contact avec la vésicule optique : en effet, la transplantation d'une vésicule optique peut suffire à induire des cristallins ectopiques à partir d'ectoderme de la tête (Grainger et al., 1997). On a vu que les données récentes suggèrent un autre modèle : le champ panplacodal est spécifié au sein de la bordure de la plaque neurale, puis régionalisé sous l'action de différentes molécules de signalisation, et une partie devient le territoire présomptif du cristallin. Certaines de ces molécules de signalisation sont probablement sécrétées par les vésicules optiques, puisque lorsque celles-ci sont ablatées, l'expression des facteurs Sox dans le territoire présomptif du cristallin est perdue, et la placode du cristallin ne se développe pas (Kamachi et al., 1998). En revanche, l'expression de Pax6 dans le territoire présomptif du cristallin ne dépend pas de la présence des vésicules optiques (Li et al., 1994).

Néanmoins, la rétine permet la croissance et le maintien de l'organisation du cristallin : en effet, des souris chez qui la rétine a été retirée chirurgicalement ont des cristallins qui ne grandissent pas normalement et dont des cellules épithéliales s'accumulent au pôle postérieur du cristallin (Yamamoto, 1976).

Il est à noter que la polarité du cristallin dépend de signaux de l'environnement : chez le poulet et la souris, l'inversion chirurgicale d'un cristallin (c'est-à-dire que l'épithélium est positionné face à la rétine) aboutit à la réversion de la polarité du cristallin : les cellules de l'épithélium s'allongent pour former des fibres, et un nouvel épithélium se forme face à la cornée, à partir de cellules nouvellement formées par la zone proliférative (Coulombre and Coulombre, 1963; Yamamoto, 1976). Toutes les cellules du cristallin sont donc compétentes pour former des fibres si elles sont placées dans le bon environnement, face à la rétine. Des explants de cristallin mis en culture avec du milieu vitré se différencient en fibres, alors qu'avec du milieu aqueux, ils se différencient en cellules épithéliales (Lovicu et al., 1995). Les facteurs responsables de la différenciation en fibres sont donc probablement contenus dans le corps vitré, et il pourrait en particulier s'agir des facteurs FGF1 et FGF2 (Lovicu and McAvoy, 2005).

b. Rôle du cristallin sur le développement des autres composants de l'œil

Le rôle du cristallin sur le développement et le maintien des autres structures de l'œil a d'abord été analysé par des expériences d'ablation. Elles ont principalement été réalisées chez des espèces comme la souris, le poulet ou le poisson-zèbre, chez qui le cristallin n'est pas capable de régénérer après ablation complète, contrairement à celui du triton (Eguchi et al., 2011; Suetsugu-Maki et al., 2012).

Chez le poulet, l'extirpation du cristallin conduit à la croissance ralentie du reste de l'œil (notamment de la cornée), au repliement de la rétine dans l'œil, à l'absence d'accumulation de substance vitreuse (Coulombre and Coulombre, 1964). Chez le poisson-zèbre, l'ablation chirurgicale du cristallin à 24hpf ne paraît pas provoquer de défauts particuliers de l'œil, mis à part un épaissement de l'épithélium pigmenté de l'iris (Semina et al., 2006).

L'interprétation des ablations chirurgicales peut toujours être contestée, car ces opérations peuvent conduire à la lésion accidentelle d'autres structures de l'œil. L'ablation du cristallin peut également être obtenue par des méthodes génétiques, en utilisant un transgène qui permet l'expression d'une toxine dans le cristallin. Ainsi, chez la souris, l'expression de la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur de *cryg2* conduit à la perte des fibres du cristallin, à une cataracte, et à une microphthalmie (l'ensemble de l'œil est plus petit que la normale). Il y a une grande variabilité dans les phénotypes, due en partie au nombre de copies du transgène. Les animaux homozygotes avec une microphthalmie sévère ont une rétine repliée, un cristallin quasi absent, la chambre antérieure, l'iris et le corps vitré malformés (Breitman et al., 1987, 1989). Le cristallin pourrait donc avoir un rôle inducteur sur le développement de la rétine.

Le phénotype est encore plus fort pour des souris transgéniques exprimant la ricine (une toxine) sous le contrôle du promoteur de *cryaa* : les cristallins sont désorganisés, comportent des vacuoles, la rétine se replie mal, les yeux sont petits et presque fermés. *Cryaa* est exprimé plus précocement que *cryg2*, ce qui peut expliquer la sévérité du phénotype. Cependant, l'épithélium du cristallin semble normal, alors que *cryaa* est supposée s'y exprimer (Landel et al., 1988).

Le problème de ces toxines est que la moindre expression aspécifique, souvent de faible intensité, peut conduire à des effets délétères. Une autre étude a donc utilisé une toxine diphtérique atténuée, dans l'espoir que les « fuites » du promoteur ne conduiraient pas à la mort de cellules en dehors du cristallin. Avec cette étude, deux classes de phénotypes étaient observées : soit des animaux avec une simple cataracte et pas de microphthalmie, soit des animaux quasi anophtalmiques (avec un rudiment de cristallin, pas de chambre antérieure ni de cristallin, et une rétine pliée). Les auteurs interprètent ces différences par le site d'insertion du transgène, favorable à l'expression ou non. Les transgènes avec des toxines trop puissantes ne permettraient la survie que pour les lignées à site d'insertion

défavorable (Breitman et al., 1990). Ainsi, quand la toxine est exprimée à fort niveau dans le cristallin, celui-ci est perdu, et l'œil a de nombreux défauts. Cependant, la rétine est toujours présente.

Des expériences d'ablation chirurgicale du cristallin ont confirmé son rôle dans la formation de la chambre antérieure de l'œil. Après ablation à HH22 chez le poulet (au stade où la somitogenèse est terminée), le stroma et l'endothélium de la cornée ne se différencient pas correctement. La présence de cellules du cristallin est nécessaire à l'induction de certains gènes dans la cornée, comme celui de la N-cadhérine (Beebe and Coats, 2000).

Chez le Xénope, l'expression de t-Bid, une protéine proapoptotique, sous le contrôle du promoteur de *cryg1* conduit à l'entrée en apoptose des fibres du cristallin au moment de leur différenciation terminale, et à la formation d'un œil de taille réduite, mais bien formé : les couches de la rétine sont présentes, ainsi que la cornée et l'iris. Le rôle inductif du cristallin sur d'autres tissus pourrait donc passer plutôt par son épithélium que par les fibres (Du Pasquier et al., 2007).

Chez le poisson-zèbre, l'expression de la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur de *cryaa* conduit à une expression spécifique de la toxine dans le cristallin. Les poissons transgéniques ont des cristallins et des rétines de taille réduite, des fibres du cristallin désorganisées, des cellules de la rétine peu différenciées et les couches de la rétine ne se forment pas. En revanche, la chambre antérieure de l'œil est normale (Kurita et al., 2003). Ce résultat semble en contradiction avec les résultats d'ablation chirurgicale, où seul l'iris était affecté (Semina et al., 2006). Il est possible que le cristallin apoptotique des transgéniques envoie des signaux délétères à la rétine, ou que le promoteur de *cryaa* choisi ait une faible activité dans le reste de l'œil en plus du cristallin.

En tous cas, le rôle du cristallin sur le développement des autres tissus de l'œil semble varier selon les espèces.

Toutes les expériences précédentes permettent d'éliminer le cristallin tardivement seulement, une fois que la plupart des tissus de l'œil sont développés. Une étude plus récente chez la souris a donc utilisé des séquences régulatrices de Pax6 permettant l'expression dans les précurseurs ectodermiques du cristallin, pour contrôler l'expression d'une toxine diphtérique atténuée : les souris portant ce transgène ne développent pas de placode du cristallin. L'épithélium de la cornée a des défauts de différenciation, la rétine en revanche se développe normalement (Zhang et al., 2008). Selon cette expérience, c'est donc uniquement sur le développement de la cornée que le cristallin aurait une influence.

C. Les animaux cavernicoles et l'espèce modèle *Astyanax mexicanus*

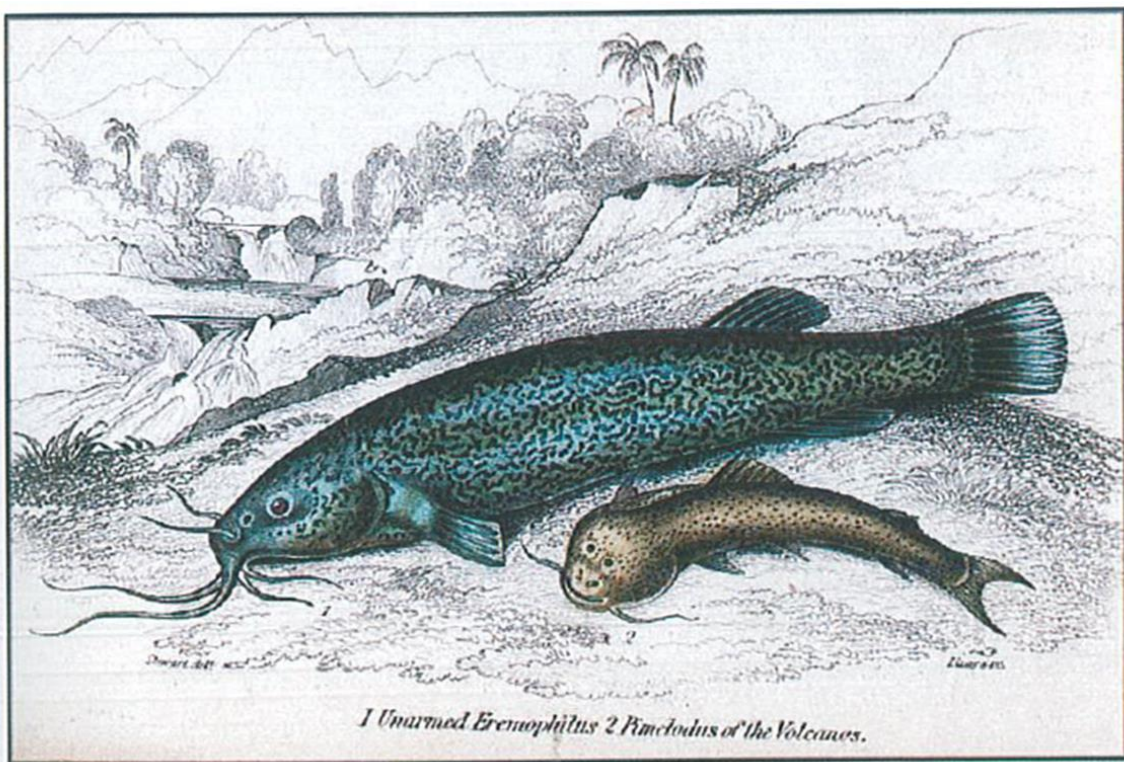


Illustration Dessin d'un poisson (« pimelode ») découvert près d'un volcan en Equateur et considéré comme cavernicole. (von Humboldt, 1805).

I. Caractéristiques du milieu cavernicole

a. Un milieu extrême

Les grottes ne sont pas rares : en 1968, 7500 étaient recensées aux Etats-Unis (Barr, 1968). Et on peut supposer qu'il existe bien plus de grottes que celles qui sont connues, car leurs entrées ne sont pas toujours visibles. Cependant, même si le milieu souterrain est fréquent, il n'en est pas moins extrême.

La première caractéristique de cet environnement est l'absence de lumière. La vie dans ce milieu nécessite donc de posséder des systèmes sensoriels performants autres que la vision. De plus, l'obscurité empêche toute activité de photosynthèse. Il n'y a donc pas de production primaire dans les grottes, à l'exception de certaines où des autotrophes chimiosynthétiques, comme des bactéries soufrées, ont été découverts (Barr, 1968). L'alimentation des animaux cavernicoles doit donc reposer sur des apports extérieurs : de la végétation en décomposition, de petits animaux de surface et des particules amenés par les courants d'eau, ou les fèces et les cadavres d'animaux qui entrent et sortent des grottes, comme les chauves-souris et les criquets (Barr, 1968). L'apport de nourriture est donc irrégulier. De plus, de nombreuses grottes sont inondées périodiquement. Des exemples sont connus pour des grottes en Yougoslavie, à Porto-Rico et à San Luis Potosi au Mexique. Ces inondations apportent de la nourriture en masse dans la grotte. Cependant, les cavernicoles aquatiques doivent trouver des refuges pour ne pas être emportés à l'extérieur (Barr, 1968).

b. Et pourtant un milieu occupé

Les grottes semblent être des milieux hostiles. Pourtant, il existe de nombreux animaux cavernicoles : par exemple, 150 espèces de téléostéens (Rétaux and Casane, 2013) et 2900 espèces de crustacés (Protas and Jeffery, 2012) cavernicoles sont décrites. De plus, ces animaux appartiennent à des phyla variés : Vertébrés, Mollusques, Plathelminthes, Annélides, Arthropodes... (Rétaux and Casane, 2013). Par quel moyen les grottes ont-elles donc été peuplées ?

Une première hypothèse suggère que les grottes ont servi de refuges au Pléistocène (une période s'étendant de 2,6 millions d'années à 12 000 ans avant le présent, caractérisée par des cycles de glaciation), à cause des changements climatiques (Barr, 1968). En effet, la température dans les grottes est souvent plus tempérée et constante que celle de l'extérieur.

L'observation de poissons (*Astyanax fasciatus* et *Brachyraphis rhabdophora*) vivant près de l'entrée d'une grotte au Costa Rica a soulevé une autre hypothèse : les poissons se réfugient dans la grotte le soir, au moment où les chauves-souris sortent chasser, apparemment pour éviter la prédation

(Romero, 1985). L'auteur propose que ce mécanisme ait pu être à l'œuvre pour expliquer la colonisation de grottes par de nombreux cavernicoles.

Plus généralement, il existe une hypothèse selon laquelle les animaux cavernicoles ont commencé par vivre seulement une partie du temps dans les grottes et le reste à la surface : ils seraient passés par une étape troglophile avant de devenir strictement troglobite, ce qui aurait facilité leur adaptation (Barr, 1968).

En effet, le fait qu'un animal de surface piégé accidentellement dans une grotte, et donc peu adapté à ce milieu extrême, réussisse à y survivre doit être un événement rare. Si l'on suppose que la colonisation de grottes est simplement le résultat d'accidents, il faut alors imaginer que ceux-ci sont très nombreux. Cela doit être le cas pour les grottes qui subissent des inondations périodiques (Barr, 1968). Et de nombreux animaux peuvent également coloniser les grottes dans le cas d'une capture d'un cours d'eau de surface (**Fig 55**). Ce phénomène correspond à l'érosion progressive du substrat par les eaux de surface, jusqu'à ce que le cours d'eau atteigne une faille profonde, et rejoigne donc une cavité en profondeur (Mitchell et al., 1977). Dans ce cas, tous les animaux présents dans le cours d'eau au moment de la capture se retrouvent piégés dans le milieu souterrain.

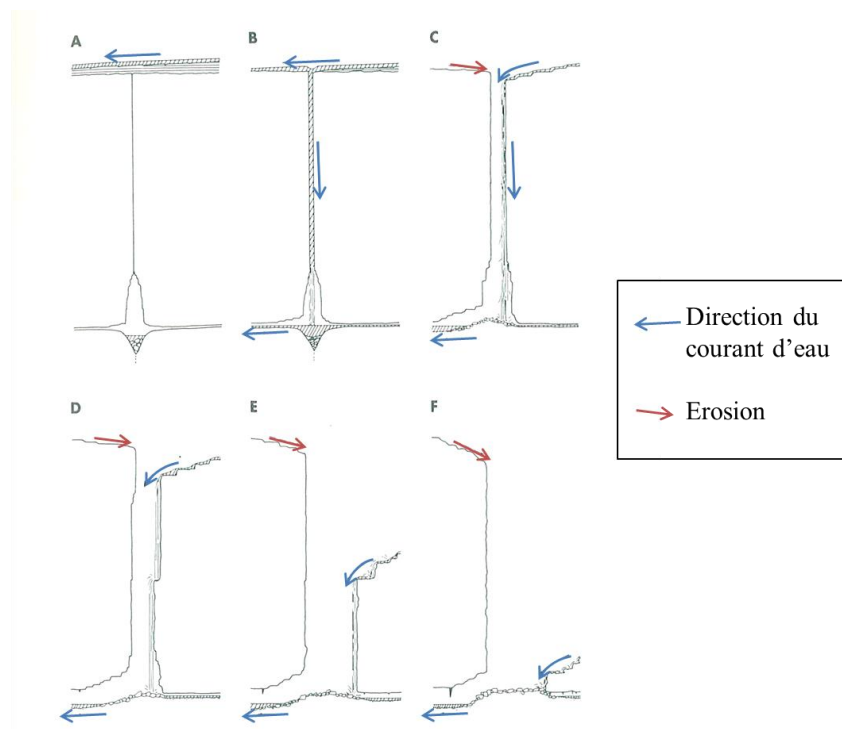


Figure 55 Formation d'un cours d'eau souterrain par capture d'une rivière. D'après (Mitchell et al., 1977).

II. Les animaux cavernicoles, des animaux dégénérés ?

a. Evolution régressive

Le premier animal cavernicole a été décrit en 1689 : il s'agissait du protée *Proteus anguinus* (Barr, 1968). Cette salamandre cavernicole est aveugle, et, dans son environnement naturel, dépigmentée (Durand, 1976).

La perte de l'œil et de la pigmentation sont fréquentes : parmi les 86 espèces de téléostéens troglomorphes connues en 2001, 60 n'ont pas d'œil visible extérieurement, et 79 ont une pigmentation au moins partiellement réduite (Romero and Paulson, 2001). D'autres évolutions par perte sont notables chez plusieurs espèces : la perte des écailles, la perte de la vessie natatoire (structure inutile dans les grottes à bassin peu profond ?) et la réduction de la ligne latérale (Romero and Paulson, 2001). L'ensemble de ces caractéristiques constitue le troglomorphisme, une condition considérée classiquement comme étant la résultante de l'adaptation au milieu cavernicole, une forme de régression vers un état moins complexe (Romero and Green, 2005).

Les animaux cavernicoles sont donc souvent pris comme exemple pour l'évolution régressive. Mais est-ce justifié ? En effet, l'évolution régressive peut être définie comme la réacquisition par des populations dérivées des mêmes états de caractères que ceux d'une population ancestrale (Porter and Crandall, 2003). Or il est peu probable que les animaux cavernicoles aient réacquis par réversion exactement les mêmes états de caractères (notamment au niveau génomique) que l'ancêtre sans yeux des Métazoaires. Il s'agit donc davantage de régression phénotypique (Porter and Crandall, 2003) : des structures sont perdues, mais cela ne préjuge pas des mécanismes de la perte qui peuvent être entièrement nouveaux.

De plus, parmi les espèces vivant en milieu souterrain, beaucoup ne perdent ni les yeux ni la pigmentation (et ne sont pas qualifiées de troglomorphes) : ainsi, seule une minorité des poissons vivant en milieu souterrain est considérée comme troglomorphe. Et parmi les troglomorphes, le degré de « régression » est variable, même pour une espèce donnée, selon les caractères étudiés (Romero Díaz, 2009, **Fig 56**).

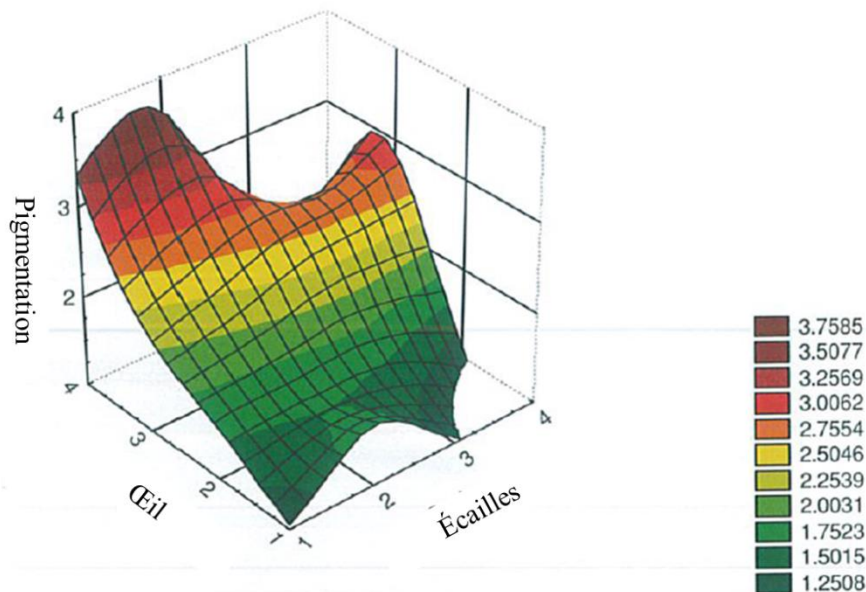


Figure 56 Représentation en « paysage » du degré de réduction de 3 caractères pour toutes les espèces de poissons troglomorphiques connues. 1 indique une absence du caractère, 4 un développement complet et normal. Le diagramme montre une absence de corrélation entre la réduction des différents traits. D'après (Romero Díaz, 2009).

Par exemple, chez le scarabée troglomorphe *Ptomaphagus hirtus*, les structures visuelles sont très réduites, mais une fonction visuelle semble persister (Friedrich et al., 2011). Cela suggère que le troglomorphisme est loin d'être une conséquence inévitable de la colonisation du milieu souterrain (Romero and Green, 2005). Il faut cependant noter que dans certains cas, l'absence de caractères troglomorphiques peut être liée à une colonisation récente du milieu souterrain. Ainsi, de nombreux auteurs relient le degré de troglomorphisme à l'ancienneté de la colonisation. Cette assertion a été prouvée récemment dans le cas d'opilions cavernicoles des Etats-Unis (Derkarabetian et al., 2010).

D'autre part, la simplification de certaines structures existe chez des animaux non cavernicoles, et est même un phénomène assez commun : pour prendre un exemple frappant, l'être humain n'est jamais considéré comme le produit d'une évolution régressive alors qu'il a perdu ses poils et a des dents de taille réduite (Romero and Green, 2005).

1. Perte de l'œil

Chez le protée, l'œil se développe quasi normalement initialement : une vésicule optique se forme, qui se différencie en rétine et en épithélium pigmenté, et le nerf optique et le cristallin se développent normalement également (Durand, 1976, **Fig 57**). La couche plexiforme interne et la couche plexiforme externe sont reconnaissables dans la rétine au moment de l'éclosion. Puis, au cours de la vie larvaire,

l'œil arrête de se différencier (le corps vitré et l'iris ne se développent pas, les nerfs oculomoteurs sont peu développés, le toit optique est de petite taille), et des vacuoles lytiques apparaissent dans le cristallin. L'œil plonge progressivement sous la peau, et le cristallin finit par disparaître (Durand, 1976). Les cellules photoréceptrices de la rétine ont un segment externe mal formé ou absent. Les bâtonnets sont très peu nombreux, et les cônes sensibles au bleu et à l'UV semblent absents (Kos et al., 2001). L'œil commence donc par se développer avant de dégénérer.

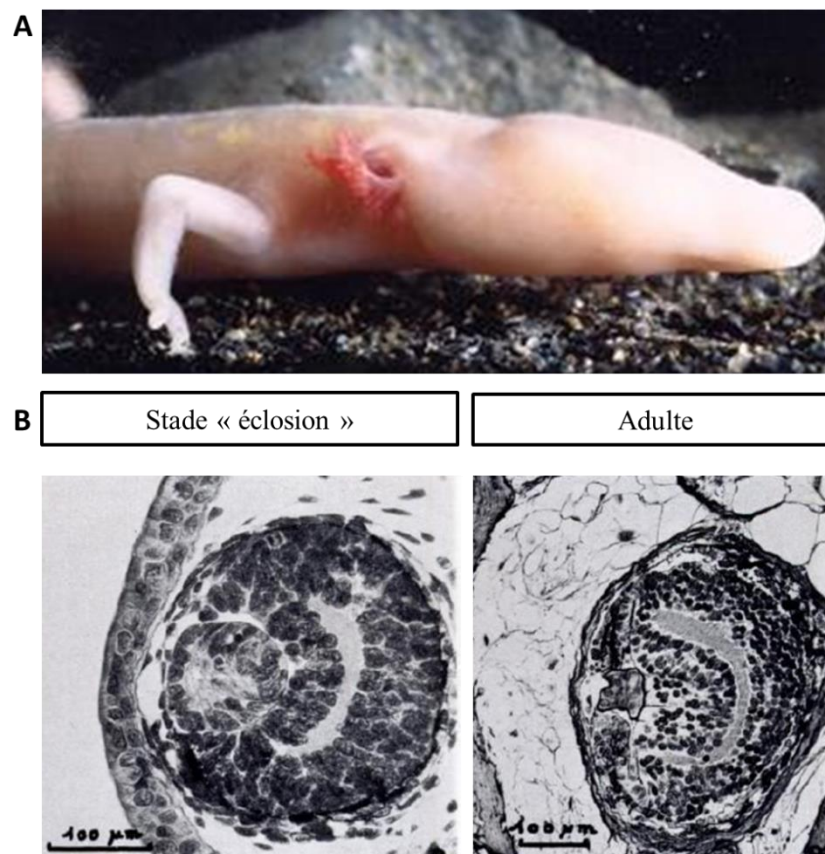


Figure 57 Développement de l'œil chez le Protée. **A** Morphologie du protée. **B** Coupes à travers l'œil du Protée à 2 stades différents. D'après (Durand, 1976; Pressac).

Le même processus se déroule chez le triton cavernicole *Typhlotriton spelaeus*. Les larves jeunes ont des yeux normaux et voient correctement (Durand et al., 1993). D'ailleurs, elles vivent dans des sources, à la lumière. A la métamorphose, les tritons quittent les sources et entrent dans des grottes sans lumière. Leurs yeux régressent, et sont microphthalmiques chez les adultes. La dégénérescence commence à la métamorphose.

Chez le poisson cavernicole somalien *Phreatichthys andruzzi*, l'œil commence aussi par se développer normalement, même s'il est un peu petit. Une rétine et un cristallin sont reconnaissables au

moment de l'éclosion (Berti et al., 2001). La RPE n'est pas pigmentée cependant. Quelques heures plus tard, le cristallin puis la rétine commencent à entrer en apoptose ; des vacuoles autolytiques et des noyaux pycnotiques apparaissent. Là aussi, l'œil finit par être internalisé sous une couche de peau.

Chez les morphotypes cavernicoles de *Poecilia mexicana*, qui ont un œil réduit à l'âge adulte, des vésicules optiques se développent également, et l'œil s'arrête de croître un peu avant l'éclosion (Riesch et al., 2011a).

Chez les poissons cavernicoles cubains *Lucifuga subterranea* et *dentata* (Fig 58), l'œil, vestigial chez les adultes, est également plus développé chez les jeunes (Cohen and McCosker, 1998).

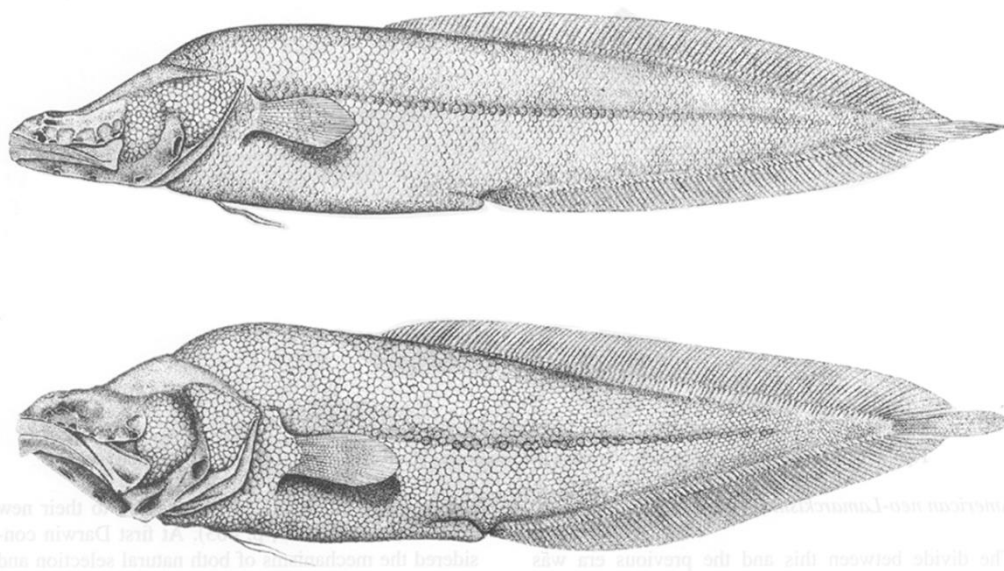


Figure 58 Illustration de 1902 de deux espèces de *Lucifuga* (*L. subterranea* en haut et *L. dentatus* e, bas), par C.H. Kennedy. D'après (Romero, 2001).

Le rat-taupe (*Heterocephalus glaber*), mentionné plus haut, a des yeux petits, très enfoncés dans la tête, bordés de graisse et aux paupières épaissies (Nikitina et al., 2004). Il est probable que les capacités visuelles de ces animaux sont très limitées : l'œil est malformé, comme détaillé ci-dessous, et les structures cérébrales qui prennent en charge les informations visuelles (le colliculus supérieur et le noyau géniculé latéral du thalamus) sont atrophiées (Crish et al., 2006). La rétine est plissée, comme si elle était trop grande pour l'orbite et il manque la couche des fibres du nerf optique. La couche des cellules ganglionnaires est, elle, réduite. Le cristallin n'est pas attaché au muscle ciliaire, il a souvent une forme irrégulière. L'épithélium du cristallin le recouvre entièrement au lieu de n'être localisé que dans la partie antérieure. Certaines cellules continuent à proliférer et à produire de nouvelles fibres du

cristallin tout au long de la vie, mais ces fibres ne se différencient apparemment pas correctement : elles n'expriment pas de cristallines γ . Là aussi, les premières étapes du développement de l'œil semblent normales, puis les défauts apparaissent (Nikitina et al., 2004).

En définitive, chez tous les Vertébrés étudiés jusqu'ici, les yeux se développent toujours, même s'ils dégénèrent par la suite (Rétaux and Casane, 2013). Il pourrait donc y avoir une contrainte développementale pour former un œil. En effet, pendant la neurulation, le champ de l'œil (dont dérivent les rétines) est séparé en 2 vésicules optiques au moment de la « plongée » des précurseurs hypothalamiques vers l'avant (England et al., 2006; Varga et al., 1999). Il est donc possible que, en l'absence de vésicules optiques, la morphogenèse du cerveau ne puisse pas s'opérer correctement.

Le crustacé isopode *Asellus aquaticus* est présent dans les eaux douces d'Europe et a envahi de manière indépendante de multiples grottes en Slovénie, Italie et Roumanie (Protas and Jeffery, 2012). Ces invasions sont récentes, la divergence entre les formes de surface et de grottes datant de moins de 100 000 ans. Les morphotypes de surface ont 4 ommatidies, chacune avec entre 1 et 4 cônes cristallins. Dans les populations cavernicoles, l'œil est très variable. Certains individus n'ont absolument pas d'ommatidie. Cela suggère qu'il pourrait ne pas y avoir de contrainte développementale à la formation d'un œil chez les crustacés. L'origine génétique de la perte de l'œil a été analysée par une étude QTL de la grotte Planina en Slovénie : une région proche du gène *lim1* impliquée dans la présence / absence d'ommatidies a été découverte (Protas et al., 2011).

Chez le crustacé amphipode *Gammarus minus*, l'œil est réduit dans les populations cavernicoles, et par des mesures de fécondité, il a été montré que ce changement était sélectionné positivement (Culver, 1995). Les auteurs proposent que la réduction de l'œil permette la réduction des régions du cerveau associées à la vision, et donc indirectement l'augmentation de la taille d'autres régions comme celles recevant les informations des antennes. Ce serait alors un exemple de « trade-off » (compromis, échange) : au cours de l'évolution, des structures sont favorisées aux dépens d'autres. Un exemple prouvé de « trade-off » concerne les coléoptères du genre *Ontophagus*. Les mâles de ces espèces utilisent des cornes (situées à différents endroits sur le corps) pour empêcher l'entrée à leur tunnel contenant des femelles. La taille importante des cornes est donc probablement avantageuse, mais leur développement nécessite une énergie importante (un coût), qui ne peut donc pas être allouée au développement d'autres structures. Ainsi, les structures proches des cornes sont réduites et l'intensité du « trade-off » diminue avec la distance par rapport aux cornes. Si les cornes sont sur le front, les antennes sont petites. Si elles sont à la base de la tête, ce sont les yeux qui sont réduits. Lorsqu'elles sont sur le thorax, les ailes sont petites (Emlen, 2001).

Quelle force évolutive conduit à la perte de l'œil dans les grottes ? Serait-ce simplement un relâchement de la pression de sélection pour la vision qui conduirait à l'accumulation de mutations

dans des gènes nécessaires au développement correct des yeux ? Chez 3 lignées amblyopsides cavernicoles, les rhodopsines accumulent des mutations, ce qui suggère un relâchement de la pression de sélection (Niemiller et al., 2013).

Chez le rat-taupe, les gènes liés à la perception visuelle accumulent des mutations et deviennent des pseudogènes (Kim et al., 2011). Cela suggère également un relâchement de la pression de sélection.

Chez les crabes philippins du genre *Sundathelphusa*, certaines populations habitent des grottes. Les caractères troglomorphiques, aussi bien régressifs (comme la perte de l'œil) que constructifs, sont apparus rapidement au cours de l'évolution, ce qui suggère que ces caractères ont été sélectionnés (Klaus et al., 2013). La valeur sélective de la perte de l'œil n'est pas claire. Peut-être s'agit-il d'une sélection indirecte pour un autre phénotype qui est déterminé par le(s) même(s) gène(s) que la taille de l'œil ?

Dans le cas de *Typlotriton spelaeus* mentionné plus haut, l'œil dégénère après la métamorphose alors que les larves, vivant à la lumière, voient correctement. Cette dégénérescence tardive suggère que le développement des autres organes sensoriels ne doit pas être affecté par cette perte. La perte de l'œil dans ce cas serait peut-être donc un avantage pour économiser le coût énergétique du métabolisme de l'œil.

2. Perte de la pigmentation

La première étape de la synthèse de la mélanine (**Fig 59**), celle de la conversion de L-tyrosine en L-DOPA semble être affectée chez de nombreux animaux albinos : chez deux espèces de cicadelles cavernicoles, une Hawaïenne (*Oliarus polyphemus*) et une Croate d'une espèce non décrite (Bilandžija et al., 2012), chez le poisson cavernicole *Amblyopsis*, et des espèces cavernicoles de planaire, millipède, éponge et bivalve (Jeffery, communication orale au congrès *Astyanax International Meeting*, 2011). En effet, chez tous ces animaux, l'incubation en présence de L-DOPA leur permet de retrouver une pigmentation.

Cette convergence suggère qu'il pourrait s'agir d'un caractère adaptatif : par exemple, la plus grande disponibilité en L-tyrosine pourrait permettre la synthèse de catécholamines (dont ce composé est également un précurseur) en plus grande quantité, ce qui participerait à l'émergence de comportements adaptatifs, par exemple en ce qui concerne la prise alimentaire (Bilandžija et al., 2012).

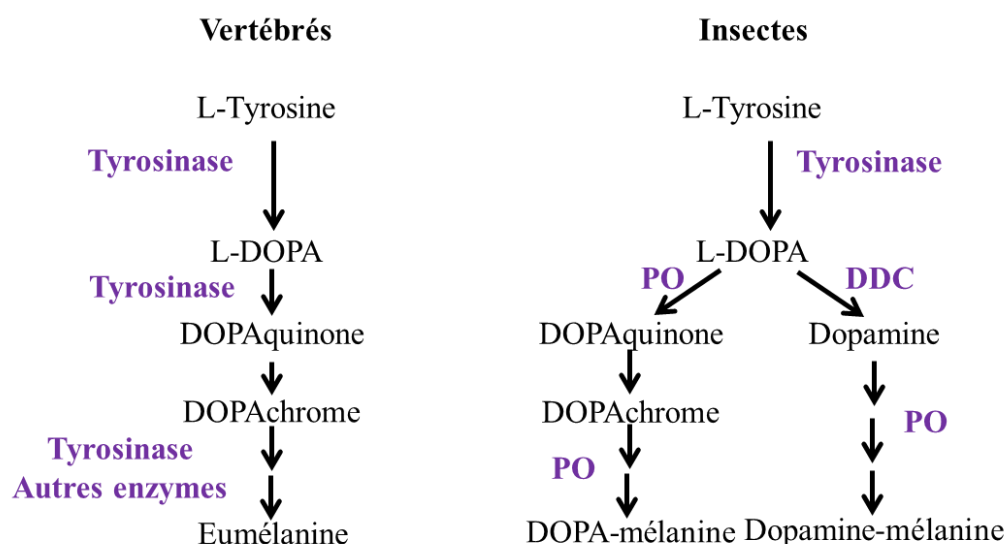


Figure 59 Voie de synthèse de la mélanine. Les enzymes sont indiquées en violet au niveau de la réaction qu'elles accélèrent. D'après (Bilandžija et al., 2012).

Chez le crustacé isopode *Asellus aquaticus*, 6 niveaux de pigmentation existent, les plus faibles n'étant présents que dans les grottes. Dans la grotte Planina, les individus sont totalement dépigmentés (Protas et al., 2011). Plusieurs gènes sont impliqués dans ces variations de pigmentation. Concernant le phénotype entièrement non pigmenté, il peut être obtenu par une seule région génomique, situé près des gènes de la tyrosine hydroxylase et de la xanthine déshydrogénase (Protas et al., 2011). Mais l'étape de synthèse de la mélanine affectée n'est pas connue chez ce crustacé.

b. Des changements constructifs

Chez les animaux cavernicoles, tous les changements ne sont pas des pertes. Au contraire, de nombreuses compensations sensorielles à la perte de la vision ont été notées chez des animaux divers. Chez certains poissons cavernicoles comme *Triplophysa gejiuensis*, les nageoires paires et les barbillons sont très longs (Romero and Paulson, 2001). Chez le crustacé cavernicole *Asellus aquaticus*, la longueur des appendices est augmentée, ainsi que le nombre de cellules chimiosensorielles (Protas and Jeffery, 2012). Les antennes sont allongées chez l'amphipode *Gammarus minus* (Culver, 1995). Chez certains amblyopsides cavernicoles, les neuromastes sont plus développés (Barr, 1968). Chez le rat-taupo, des poils sensoriels ressemblant à des vibrisses sont distribués sur les côtés du corps et permettent une orientation dans l'espace grâce au toucher (Crish et al., 2003).

Les animaux cavernicoles peuvent également développer des comportements inédits. Ainsi les salamandres *Eurycea rathbuni*, *Haideotriton* et *Gyrinophilus palleucus*, l'écrevisse *Orconectes*

pellucidus, l'isopode *Asellus* et les amphipodes *Stygobromus* et *Crangonyx* sont attirés par les vibrations à la surface de l'eau (Barr, 1968). Ce comportement, délétère dans une rivière avec des prédateurs, serait avantageux dans une grotte où la nourriture est rare et « tombe » dans l'eau en provoquant des vibrations.

D'autres changements, liés au métabolisme, peuvent être considérés comme constructifs. Le protée par exemple jouit d'une exceptionnelle longévité, avec une espérance de vie de plus de 60 ans (Voituron et al., 2011), tout comme le rat-taupe qui peut survivre jusqu'à 28 ans (Buffenstein and Jarvis, 2002). Le protée peut également résister à de longues périodes d'anoxie (Issartel et al., 2009), et à un jeûne prolongé (Hervant et al., 2001), et récupère rapidement dans les deux cas.

Tous ces changements montrent bien que les animaux cavernicoles se sont adaptés à leur environnement, et qu'ils ne sont pas « dégénérés ». Ces animaux, longtemps considérés comme des « impasses évolutives » (Desutter-Grandcolas, 1997), peuvent en fait constituer des lignées florissantes : par exemple, les Rémipèdes, une classe de Crustacés qui existe depuis le Permien (-250 Ma), sont tous cavernicoles (Rétaux and Casane, 2013).

Concernant les forces évolutives à l'œuvre, il paraît logique d'imaginer que certains changements constructifs soient adaptatifs, et qu'ils aient été sélectionnés au cours de l'évolution dans les grottes. Pour les pertes évoquées plus haut, le rôle de la dérive génétique dans des petites populations, pour des traits qui ne sont plus sous sélection, a souvent été évoqué. Mais d'autres mécanismes ont pu être à l'œuvre : ainsi, concernant l'albinisme, c'est peut-être la disponibilité en L-Tyrosine qui a été sélectionnée (Bilandžija et al., 2012). La sélection dans ce cas aurait donc été indirecte.

III. *Astyanax mexicanus*, espèce modèle cavernicole

a. Histoire évolutive des *Astyanax*

1. Position phylogénétique des *Astyanax mexicanus*

Les *Astyanax mexicanus* sont des poissons téléostéens, des poissons osseux à nageoire rayonnée. Selon la phylogénie moléculaire, les Téléostéens seraient apparus il y a 330-280 Ma, alors que les fossiles les plus anciens découverts à ce jour datent de la fin du Trias ou du Jurassique, soit 100 Ma plus tard (Helfman, 2009; Near et al., 2012, **Fig 60**). Ceci suggère que l'horloge moléculaire est difficile à calibrer, et que les temps de divergence estimés par les phylogénies moléculaires sont sujets à caution.

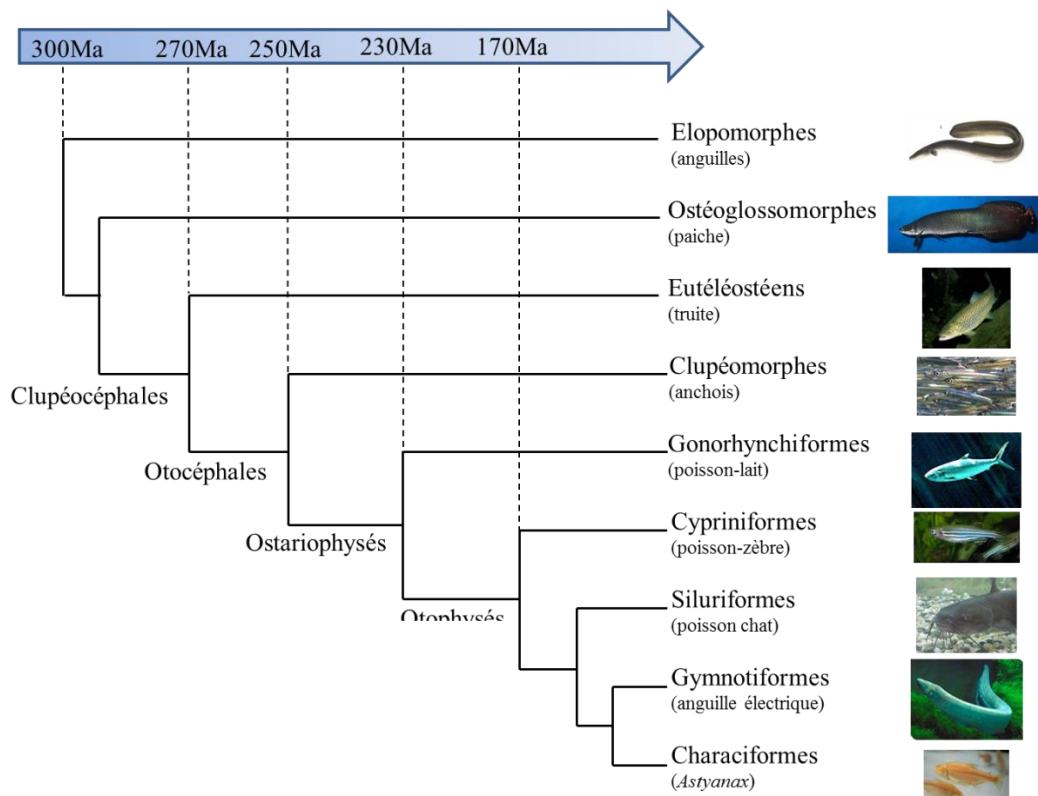


Figure 60 Phylogénie des Téléostéens. D'après (Near et al., 2012).

Au sein des Téléostéens, les *Astyanax* font partie des Otocéphales qui représentent 1/4 de la diversité des poissons (Peng et al., 2006). Encore plus précisément, ils font partie des Ostariophysés qui sont surtout des poissons d'eau douce. Au sein de ce groupe, le poisson-zèbre (*Danio rerio*), l'espèce modèle majeure des Téléostéens, et l'*Astyanax*, font partie des Otophysés, un clade défini morphologiquement par la présence de l'appareil de Weber, une modification de l'oreille interne, de la

vessie natatoire et de plusieurs vertèbres qui permet une audition performante (Briggs, 2005). En revanche, alors que le poisson-zèbre fait partie des Cypriniformes, l'*Astyanax* est un Characiforme. Selon les phylogénies moléculaires, ce groupe n'apparaît pas toujours comme monophylétique (Nakatani et al., 2011; Peng et al., 2006), alors qu'il n'y a aucune controverse si l'on se base sur la morphologie : les Characiformes possèdent une nageoire adipeuse située postérieurement à la nageoire dorsale et des écailles périphériques cténoïdes au lieu de cycloïdes, qui sont des synapomorphies du groupe (Helfman, 2009).

La divergence entre les Characiformes et les Cypriniformes est estimée entre 170 et 250 Ma selon les analyses (Nakatani et al., 2011; Near et al., 2012; Peng et al., 2006). Les *Danio* et les *Astyanax* sont donc éloignés phylogénétiquement, et il est difficile de se reposer sur les données moléculaires du poisson-zèbre pour travailler sur l'*Astyanax*.

Au sein des Characidés, l'analyse des séquences de 3 gènes mitochondriaux et 1 gène nucléaire montre que les *Astyanax mexicanus* seraient proches de certains *Hemigrammus* et *Hyphessobrycon* (Javonillo et al., 2010). Cependant, aucun de ces genres ne semble monophylétique. Ainsi, l'espèce sœur d'*Astyanax mexicanus* serait *Hyphessobrycon anisitsi* (Fig 61). Selon une autre analyse phylogénétique de poissons proches d'*Astyanax mexicanus* échantillonnés dans toute l'Amérique Centrale, les *Astyanax* et les *Bramocharax*, des genres qui avaient été distingués par leur morphologie, sont paraphylétiques (Ornelas-García et al., 2008). Parmi les espèces les plus proches d'*Astyanax mexicanus* figureraient donc *Bramocharax dorioni*, *Bramocharax bransfordi* et *Bramocharax caballeroi*. La similitude morphologique entre les espèces d'*Astyanax* d'une part et les *Bramocharax* d'autre part ne serait que le résultat de convergences liées à des spécialisations trophiques.



Figure 61 Photographies de *Astyanax mexicanus* SF (A), *Astyanax mexicanus* CF Pachón (B), *Bramocharax bransfordii* (C) et *Hyphessobrycon anisitsi* (D). C d'après (Eshom et al.).

2. Taxonomie et histoire des différentes populations

La forme de surface de *Astyanax mexicanus* aurait été décrite au départ par Cuvier en tant que *Chalceus fasciatus* à partir d'un spécimen du Brésil, puis réassignée au genre *Astyanax* après qu'il ait été créé par Baird & Girard en 1854 (Romero and Paulson, 2001). Pourtant, la vision actuelle est que les *Astyanax mexicanus* ne sont présents qu'au Mexique, et que les formes en dehors de ce pays sont des *Astyanax*, des *Bramocharax* ou des *Hyphessobrycon* d'autres espèces (Ornelas-García et al., 2008).

La première population de grotte (de La Cueva Chica) a été décrite en tant que *Anoptichthys jordani* (Hubbs and Innes, 1936). Une centaine d'individus vivants avaient été collectés par C. Basil Jordan pour description. Les poissons paraissent ne pas avoir d'yeux, du moins en vue externe, et sont dépigmentés. Ces premières analyses permirent déjà d'identifier l'attraction de ces poissons pour les vibrations à la surface de l'eau. Il s'agissait alors de la seule espèce décrite de Characidé aveugle. Deux autres ont été décrites depuis : *Stygichthys typhlops* (Romero and Paulson, 2001) et une population cavernicole probablement de l'espèce *Astyanax aeneus* (Espinasa et al., 2001).

La population de La Cueva El Pachón, la population cavernicole d'*Astyanax* étudiée le plus largement, a été la 2^e décrite et a été appelée *Anoptichthys antrobius* (Alvarez, 1946). En tout, 29 populations cavernicoles d'*Astyanax mexicanus* ont été décrites, réparties dans 3 zones géographiques au Nord-Est du Mexique : la Sierra de El Abra, la région Guatemala et la région Micos (Gross, 2012, **Fig 62**). Nombre de ces populations sont aveugles et dépigmentées (Jeffery, 2009). Leur appartenance à la même espèce que les formes de surface a été établie en premier lieu par l'étude d'allozymes qui montrait que les différences génétiques étaient trop peu nombreuses pour séparer les 2 morphotypes en 2 espèces (Avisé and Selander, 1972).

Dans l'espèce maintenant appelée *Astyanax mexicanus* existent donc à la fois des morphotypes de surface (SF) et des morphotypes cavernicoles (CF). Cette situation quasi-unique fait de cette espèce un modèle de choix pour comprendre les mécanismes de microévolution. Il est en effet possible de comparer des individus très proches phylogénétiquement, dont la divergence a dû être essentiellement gouvernée par les différences d'environnement. Les autres espèces cavernicoles avec des formes de surface proches sont rares : des planaires, des cicadelles *Oliarus*, l'amphipode *Gammarus minus*, le poisson *Poecilia mexicana* (Protas and Jeffery, 2012). Chez *Astyanax*, le fait qu'il s'agisse d'une espèce unique permet également de croiser des individus des 2 formes et d'obtenir des hybrides fertiles (Şadoğlu, 1957).

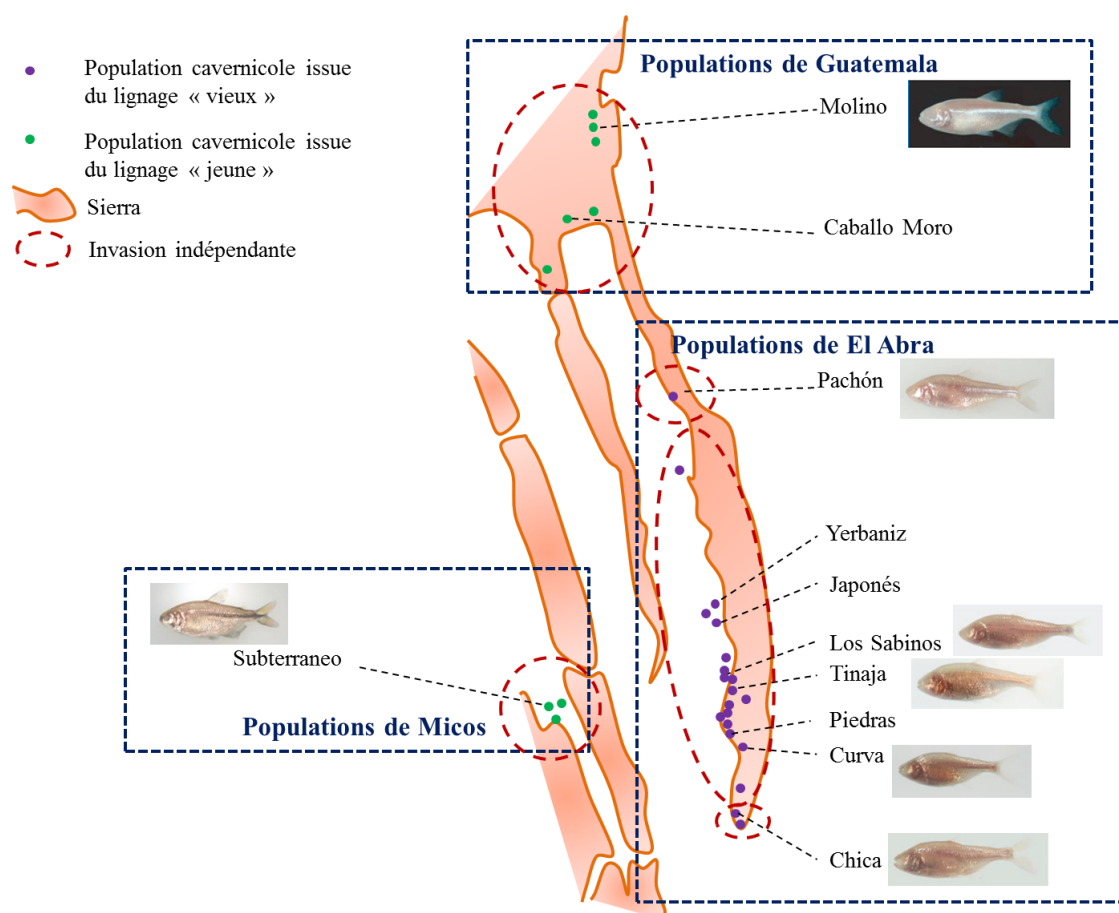


Figure 62 Localisation des populations cavernicoles d'*Astyanax mexicanus*. D'après (Bradic et al., 2012; Gross, 2012; Jeffery, 2009).

Ces croisements ont également lieu naturellement dans certaines grottes, comme Subterraneo (Mitchell et al., 1977). Dans cette grotte, ce sont probablement des inondations saisonnières qui permettent aux morphotypes de surface d'entrer et de se reproduire avec les morphotypes cavernicoles. On y trouve donc des individus troglomorphiques et d'autres qui ressemblent à des hybrides, mais aucun morphotype de surface (Bibliowicz, Alié et al., 2013). Cela suggère que les morphotypes de surface ne peuvent pas survivre longtemps dans les grottes.

Le fait que les phénotypes cavernicoles persistent dans un contexte d'hybridations fréquentes est étonnant : en effet, la plupart des phénotypes cavernicoles sont récessifs (comme il sera discuté ultérieurement). Ces phénotypes pourraient donc facilement ne plus être apparents après quelques générations d'hybridation. Il faut donc en conclure que ces phénotypes doivent être avantageux, et que les morphotypes cavernicoles survivent mieux que les hybrides et les formes de surface dans les grottes. La persistance des phénotypes cavernicoles pourrait être facilitée par l'existence d'un début de barrière reproductive entre SF et CF, comme c'est apparemment le cas chez *Poecilia mexicana*

(Riesch et al., 2011b). En effet, il semble que les génomes des SF et des CF contiennent déjà des allèles incompatibles entre eux, ce qui aboutit à une transmission non mendélienne de certains allèles et à la cotransmission d'allèles non liés génétiquement (Borowsky and Cohen, 2013). Par exemple, les allèles Pachón aux loci de *Oca2* et de *Mc1r*, 2 gènes impliqués dans la pigmentation, ont tendance à être transmis ensemble alors qu'ils ne sont pas sur le même groupe de liaison, ce qui aboutit à maintenir ensemble les allèles d'une seule population à ces loci. Les phénomènes d'hybridation permettent en tous cas des flux de gènes (ou introgressions) des Astyanax SF vers les CF (Bradic et al., 2012).

La question de l'origine unique ou multiple des populations cavernicoles se pose depuis que l'on a reconnu que toutes les populations CF appartenaient à la même espèce que les SF : une seule population initiale a-t-elle colonisé le milieu souterrain avant de se répartir dans plusieurs grottes ou y a-t-il plusieurs ancêtres distincts aux différentes populations cavernicoles actuelles ? Le sous-sol de la région est en effet constitué de roche calcaire, que l'eau érode facilement, si bien que de nombreuses grottes peuvent être en contact ou l'avoir été par le passé, sans que l'exploration humaine puisse le montrer (Mitchell et al., 1977).

Les premières hypothèses concernant une origine multiple étaient basées sur des caractères morphologiques tels que la pigmentation ou la taille de l'œil (Wilkens and Burns, 1972). Ensuite, une étude de phylogénie moléculaire, basée sur le gène NADH_2 , a appuyé l'hypothèse de deux lignages cavernicoles distincts : un lignage comprenant Pachón et Subterraneo, et un autre comprenant Tinaja, Los Sabinos et Curva (Dowling et al., 2002). Cette hypothèse était confirmée par la variation du nombre de vertèbres thoraciques : 12 chez les populations de surface et les Pachón, 11 chez Tinaja et Los Sabinos.

Au fil des études de phylogénie moléculaire, il est devenu clair que les gènes nucléaires et mitochondriaux ne racontaient pas la même histoire. L'analyse des gènes nucléaires montre l'existence de 2 lignages, l'un, « jeune », comprenant les populations de surface et des individus de la grotte Chica, l'autre, « vieux », des individus des grottes Pachón, Tinaja et Los Sabinos. Au contraire, selon les gènes mitochondriaux, les Pachón font partie du lignage « récent ». L'explication proposée est que les Pachón ont subi une invasion récente de poissons de surface et ont subi une hybridation, dont le génome mitochondrial est un témoin (Hausdorf et al., 2011). Les phénomènes d'hybridation avec des formes de surface seraient en fait assez communs (Bradic et al., 2012).

L'étude la plus complète à ce jour, basé sur l'analyse de 26 microsatellites, confirme l'hypothèse de deux vagues d'invasion des grottes : la plus ancienne, issue d'une population de surface aujourd'hui éteinte, ayant donné lieu aux populations de la région de El Abra (Pachón, Yerbániz, Japonés, Arroyo, Tinaja, Curva, Toro et Chica), et la plus récente, ayant permis la fondation des populations des régions

Guatemala (Molino et Caballo Moro) et Micos (Subterraneo) (Bradic et al., 2012). Il y aurait même eu davantage d'événements de colonisation de grottes, et 5 groupes de populations cavernicoles seraient en fait indépendants : Pachón, Chica, le reste des populations de El Abra, les populations de Guatemala, et celles de Micos (Bradic et al., 2012). Si certaines lignées cavernicoles sont réellement indépendantes entre elles, cela permettra l'étude des convergences phénotypiques.

Les grottes ont dû être colonisées il y a plusieurs millions d'années, environ 3 selon l'analyse de séquences de cytochrome b (Strecker et al., 2004). Cette datation correspond approximativement à la fermeture de l'isthme de Panama (3.3Ma), événement qui aurait permis la colonisation de l'Amérique Centrale par les formes de surface depuis l'Amérique du Sud (Strecker et al., 2004). Ainsi, dès leur arrivée en Amérique Centrale, certains des *Astyanax* auraient été piégés dans des grottes. La divergence entre SF et CF a également été datée en calibrant certains nœuds des arbres phylogénétiques avec des fossiles, et le temps estimé est équivalent (2.2Ma) (Porter et al., 2007). Mais une étude récente suggère que la colonisation de l'Amérique Centrale a pu être beaucoup plus précoce, vers 7-8 Ma (Ornelas-García et al., 2008).

b. Modifications phénotypiques chez les adultes

1. Perte de la pigmentation

Les morphotypes de surface sont pigmentés : ils possèdent des mélanophores, les cellules qui produisent le pigment noir appelé mélanine, dont la densité est la plus forte sur le dos, mais aussi des iridophores (produisant un pigment argenté) et des xanthophores (produisant un pigment jaune) (Wilkens, 1988).

Plusieurs populations cavernicoles ont perdu leur pigmentation. Ainsi, le nombre de mélanophores est réduit, mais également leur contenu en mélanine. Les populations Pachón, Molino et Yerbaniz sont albinos, c'est-à-dire que leurs mélanophores ne contiennent pas de mélanine du tout (Protas et al., 2005; Wilkens, 1988).

i. Albinisme

La mutation à l'origine de l'albinisme a été découverte grâce à une étude de QTL basée sur un croisement SF * Molino. Cette analyse a montré qu'un seul locus contrôlait l'essentiel de la variabilité de la pigmentation. Le même locus est en cause chez les Pachón. Le gène *Oca2*, impliqué dans des maladies pigmentaires humaines, est situé dans le QTL. Il comporte des délétions génomiques d'exons différents chez Pachón (une population du lignage « ancien ») et Molino (une population « jeune »). Testées en culture cellulaire, ces deux versions tronquées d'*Oca2* sont non fonctionnelles. Le même gène est donc responsable de l'albinisme dans 2 populations cavernicoles indépendantes, via des

mutations différentes (Protas et al., 2005). Ceci est un cas d'évolution parallèle, où le même phénotype est dû à la perte de fonction du même gène. Encore plus surprenant, il semble que des individus de la grotte Subterraneo, eux aussi du lignage « jeune » mais dont la grotte se trouve dans une sierra différente, portent également la même mutation (Gross and Wilkens, 2013). Cette mutation devait donc exister à faible fréquence dans les populations de surface ancestrales, et elle s'est ensuite fixée indépendamment dans les différentes populations cavernicoles. Il est important de noter également que l'expression de *Oca2*, notamment aux stades embryonnaires, est réduite chez les CF Pachón : cela pourrait être dû au fait que l'ARNm tronqué est déstabilisé, mais cela pourrait également être dû à des mutations supplémentaires dans des séquences régulatrices (Bilandžija et al., 2013).

Comment expliquer que ce gène précis ait été la cible de mutations répétées au cours de l'évolution ? Les auteurs suggèrent plusieurs explications : d'abord, ce gène est très long, ce qui en fait une cible de mutations probable. Ensuite, chez l'Homme, il se situe dans une région du génome où les réarrangements (et donc les mutations) sont fréquents (Yi et al., 2003). Enfin, ce gène n'a apparemment de rôle que dans la pigmentation, sa perte de fonction n'est donc pas délétère, ce qui n'est peut-être pas le cas pour tous les autres gènes impliqués dans la pigmentation.

La fonction exacte de ce gène est controversée. *Oca2* serait une protéine membranaire des mélanosomes et serait nécessaire à la localisation correcte de la tyrosinase dans les mélanosomes (Toyofuku et al., 2002). Sa fonction serait donc essentielle pour les premières étapes de la synthèse de la mélanine, à l'étape de conversion de L-tyrosine en L-DOPA, la même étape qui est affectée chez de nombreux animaux cavernicoles (Bilandžija et al., 2012). Ceci renforce donc un peu plus l'hypothèse de la sélection pour la disponibilité en L-tyrosine pour la synthèse des catécholamines. En effet, les CF ont un phénotype « hyper-aminergique », c'est-à-dire que le taux de dopamine, noradrénaline et sérotonine dans leur cerveau est élevé (Elipot et al., 2014). Cela pourrait être dû en partie à une plus grande disponibilité de L-tyrosine. La L-tyrosine est en effet en quantité augmentée dans les cerveaux des CF Pachón, et la répression de *Oca2* chez les SF conduit à l'augmentation de la concentration de L-Tyrosine, ainsi qu'à celle de la dopamine (Bilandžija et al., 2013). Il semble donc bien y avoir un lien direct entre la perte de la pigmentation et l'augmentation du taux de dopamine. La L-tyrosine en excès pourrait entrer dans la circulation sanguine et être finalement utilisée dans le cerveau pour la synthèse des catécholamines. C'est donc peut-être cette modification qui aurait été sélectionnée. Les catécholamines comme la dopamine et la noradrénaline sont en effet très importantes pour contrôler certains comportements qui sont modifiés chez les CF (voir paragraphe C III b 4).

i. Phénotype « brown »

Chez certains cavernicoles (Curva, Los Sabinos, Piedras, Yerbaniz, Japonés, et chez les Pachón non-albinos), le nombre de mélanophores et leur contenu en mélanine sont simplement réduits, ce qui

donne aux cellules pigmentées une couleur marron plutôt que noire : ce phénotype est appelé « brown » (Jeffery, 2009). Par une approche QTL, l'altération génétique responsable de ce phénotype a été établie dans les populations Yerbaniz, Japonés et Pachón : il s'agit de mutations dans le gène *mc1r*, un récepteur de la mélanocortine dont l'activation stimule la synthèse de la mélanine (Gross et al., 2009). Une fois encore, deux mutations indépendantes sont en cause : une délétion de 2 pb chez Pachón et une mutation ponctuelle chez Yerbaniz et Japonés. Cette évolution parallèle soulève la question d'une éventuelle sélection du phénotype « brown ». Aucun rôle de *mc1r* n'est connu en dehors de la pigmentation. Les mutations pourraient malgré tout avoir un effet avantageux sur un autre phénotype. Cependant, les allèles mutés de *mc1r* ne sont pas fixés dans les populations cavernicoles (Gross et al., 2009). La sélection ne serait donc pas assez forte pour provoquer la fixation de ces mutations, ou alors celles-ci pourraient être apparues trop récemment pour avoir déjà atteint la fixation. D'autres part, les QTL influençant le nombre de mélanophores ont des polarités variées (c'est-à-dire que les allèles CF ne conduisent pas tous à la diminution du nombre de mélanophores), ce qui écarte aussi l'hypothèse de sélection (Protas et al., 2008).

Autre point intéressant, nous avons mentionné précédemment que certains allèles de loci non-liés étaient transmis ensemble, du fait d'une incompatibilité naissante entre les génomes SF et CF (Borowsky and Cohen, 2013). Or *Mc1r* et *Oca2* font partie de ces gènes transmis ensemble, qui ont probablement des relations épistatiques. Et au moins 3 populations (Pachón, Yerbaniz et Japonés) ont des mutations dans ces deux gènes. Borowsky suggère donc que la mutation d'un seul de ces gènes a pu être sélectionnée initialement, et que la mutation de l'autre gène a pu être co-transmise sans être avantageuse. Au vu des données sur *Oca2*, il serait donc possible que la perte de fonction de *Oca2* ait été sélectionnée en raison de son effet sur les catécholamines, et que la mutation de *Mc1r* se soit répandue de manière neutre dans la population cavernicole, grâce à sa relation épistatique avec *Oca2*.

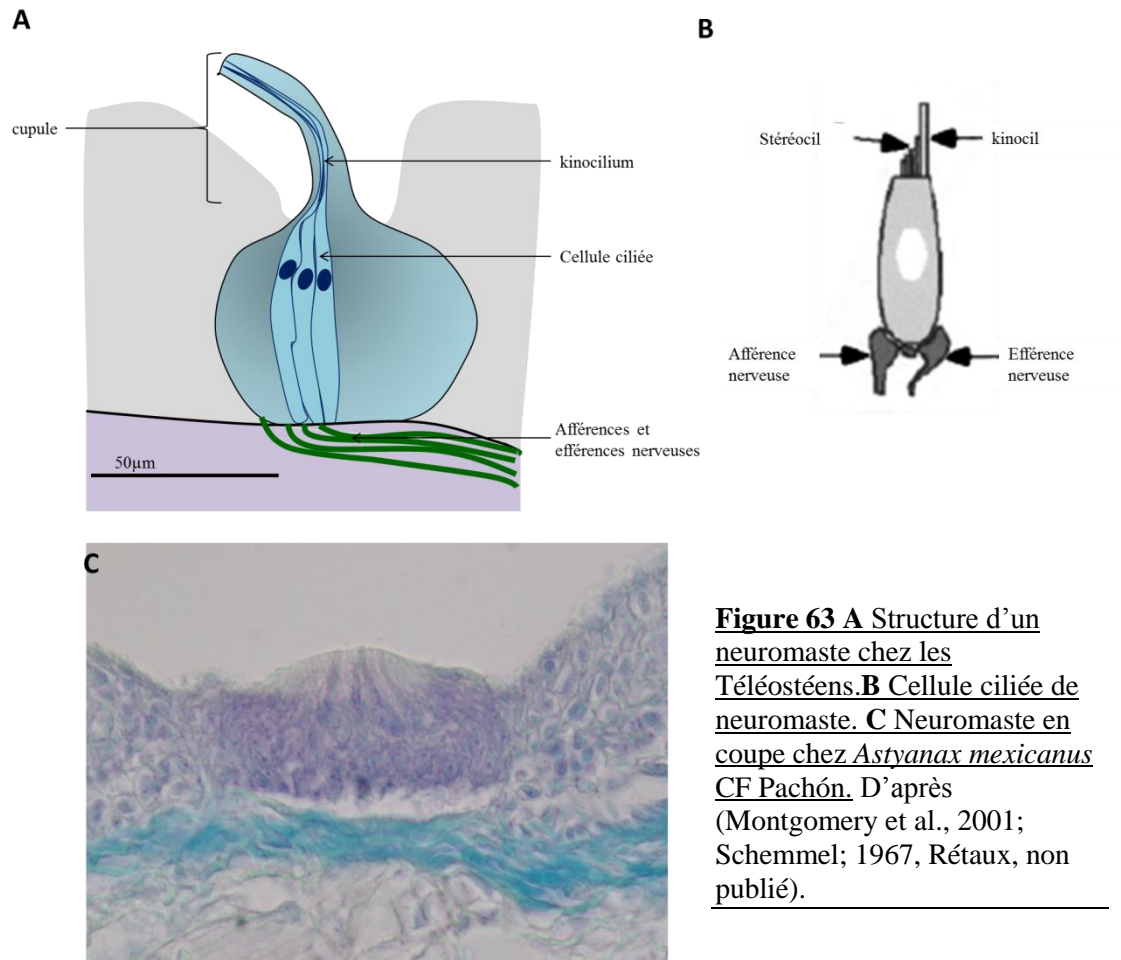
2. Modifications sensorielles

La modification la plus flagrante chez plusieurs populations cavernicoles est la perte de l'œil, qui sera abordée dans un prochain chapitre. Cependant il existe d'autres modifications sensorielles.

i. Ligne latérale et neuromastes

Les poissons sont capables de détecter les variations de pression dans l'eau par le biais de récepteurs appelés neuromastes. Les neuromastes superficiels, des groupes de cellules ciliées, sont distribués sur tout le corps. Les kinocils des cellules sont rassemblés en une structure gélatineuse appelée cupule (**Fig 63**). Lorsque des mouvements d'eau déplacent la cupule, le signal est transmis aux cellules ciliées. Ces neuromastes perçoivent les mouvements de faible fréquence, mais sont rendus inopérants dès que l'animal se déplace. Un deuxième type de neuromastes, les neuromastes-canaux,

sont localisés dans des canaux ouverts sur l'environnement par des pores. Cela atténue les mouvements de l'eau par rapport au milieu extérieur et permet une bonne perception même quand l'animal se déplace (Montgomery et al., 1995).



Les premières études sur ce système chez l'*Astyanax* ont montré que les Pachón et les Sabinos avaient davantage de neuromastes libres sur la tête que les morphotypes de surface (Schemmel, 1967). Une autre analyse par immunohistochimie anti prox1 a confirmé que le nombre de neuromastes était augmenté chez les larves de CF Pachón, Chica et Los Sabinos à 4 et 14dpf (Jeffery et al., 2000). Le marquage des neuromastes grâce à un colorant vital (DASPEI) à des stades plus tardifs montre que le nombre et la taille des neuromastes superficiels augmentent au cours du développement, et que l'augmentation est plus rapide chez les CF Pachón : dès 2 mois, ils possèdent plus de neuromastes superficiels, particulièrement dans une région au niveau du 3^e os crânial suborbital (Yoshizawa et al., 2010, **Fig 64**).

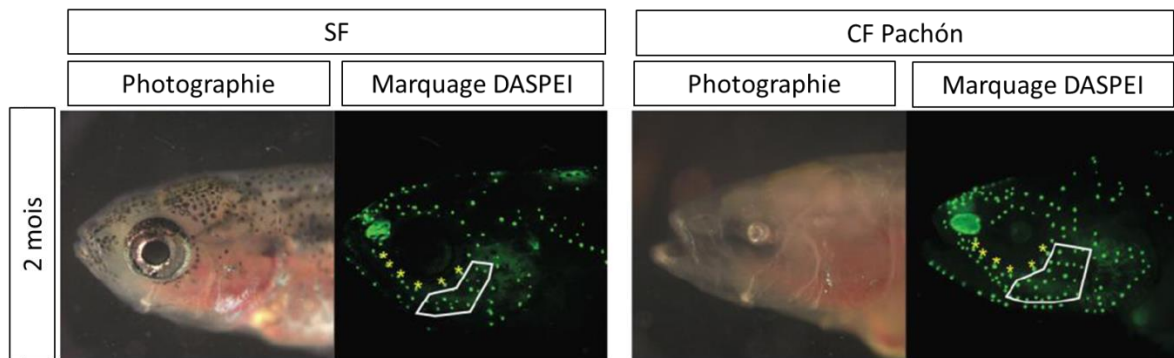


Figure 64 Neuromastes chez *Astyanax mexicanus*. Le marquage DASPEI permet de visualiser les neuromastes. Vues latérales, antérieur à gauche. D'après (Yoshizawa et al., 2010).

Une seule étude est en désaccord avec l'hypothèse d'un plus grand nombre de neuromastes chez les CF : l'observation par immunohistochimie anti-tubuline des neuromastes suggère que leur nombre et leur distribution sont identiques chez les SF et les CF Pachón à 5,12 et 22dpf (Varatharasan et al., 2009). Le désaccord entre ces études pourrait être dû au fait que les marqueurs utilisés ne sont pas les mêmes, et que l'un d'eux ne marque pas tous les neuromastes.

Concernant la structure des neuromastes, observée en microscopie confocale ou en microscopie à balayage électronique, il semble que le kinocil des CF est plus long (Teyke, 1990; Varatharasan et al., 2009) et que les neuromastes des CF sont 2 fois plus larges (Teyke, 1990; Yoshizawa et al., 2010). Une étude récente confirme ce fait : les neuromastes des CF Pachón et Los Sabinos seraient plus larges et contiendraient plus de cellules ciliées que ceux de SF, et seraient de ce fait plus sensibles aux vibrations (Yoshizawa et al., 2013a).

ii. Bourgeons du goût

Les bourgeons du goût sont les structures à la base de la perception du goût. Ces structures sont composées de plusieurs types cellulaires : les cellules claires et sombres qui sont les récepteurs sensoriels, avec leurs terminaisons apicales qui protrudent dans l'environnement extérieur ; les cellules basales, en forme de disques, sous les cellules sensorielles, qui seraient des interneurons sérotoninergiques (**Fig 65**). Des cellules marginales délimitent le bourgeon du goût par rapport à l'épithélium de la peau environnant (Varatharasan et al., 2009). Chez les poissons, les bourgeons du goût sont présents sur les lèvres et la tête.

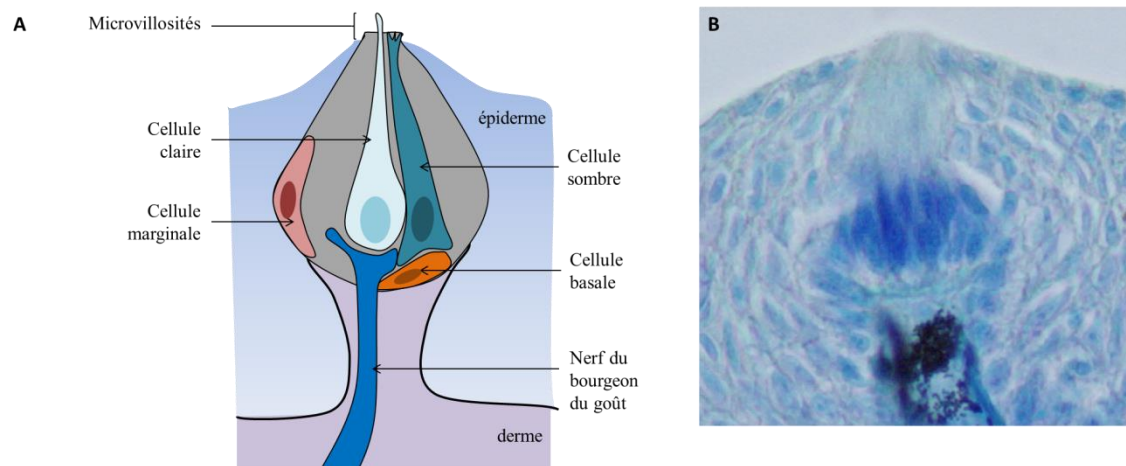


Figure 65 **A** Structure d'un bourgeon du goût chez les Téléostéens. **B** Bourgeon du goût en coupe chez *Astyanax mexicanus* SF. D'après (Hansen et al., 2002; Rétaux, non publié).

La densité de bourgeons du goût et la zone où ils sont présents sont augmentées dans les adultes des populations Pachón et Los Sabinos (Schemmel, 1967, Fig 66).

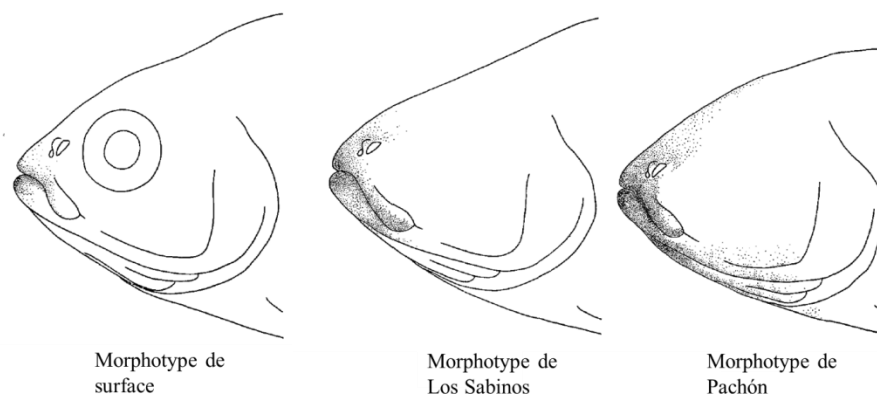


Figure 66 Distribution de bourgeons du goût chez *Astyanax mexicanus*. D'après (Schemmel, 1967).

Ils sont aussi en plus grand nombre dès les stades larvaires, sur les larges mâchoires des CF Pachón (Yamamoto et al., 2009). Au même stade, les embryons cavernicoles ont environ 3 fois plus de bourgeons du goût que les SF (Jeffery et al., 2000).

Les bourgeons du goût, au cours du développement, expriment Shh. Or l'expression de Shh est étendue chez les CF Pachón en fin de gastrulation (Yamamoto et al., 2004) puis dans la région oropharyngée à 2 et 3dpf (Yamamoto et al., 2009), au moment du développement des bourgeons du

goût. Cette augmentation de l'expression de Shh est en fait la cause de l'augmentation du nombre de bourgeons du goût (Yamamoto et al., 2009). Le nombre de bourgeons augmente au cours du développement, et il augmente plus vite chez les CF Pachón, donc la différence initiale est rapidement amplifiée (Varatharasan et al., 2009). Une étude de l'ultrastructure des bourgeons du goût chez l'*Astyanax*, par microscopie électronique, suggère qu'ils contiennent plus d'axones chez les CF (Boudriot and Reutter, 2001). Cette différence n'a pas été retrouvée dans l'article de Varatharasan, mais en revanche, ils ont compté davantage de cellules réceptrices par bourgeon.

ii. Olfaction

Le système olfactif se compose d'une partie sensorielle dans la narine, l'épithélium olfactif, qui comporte les neurones olfactifs sensoriels (**Fig 67**). Ces neurones expriment les récepteurs olfactifs qui lient les molécules odorantes et projettent des axones vers le bulbe olfactif, la région du télencéphale qui traite les informations olfactives. La zone de projection (ou glomérule) dépend du récepteur olfactif exprimé (Lledo and Gheusi, 2003).

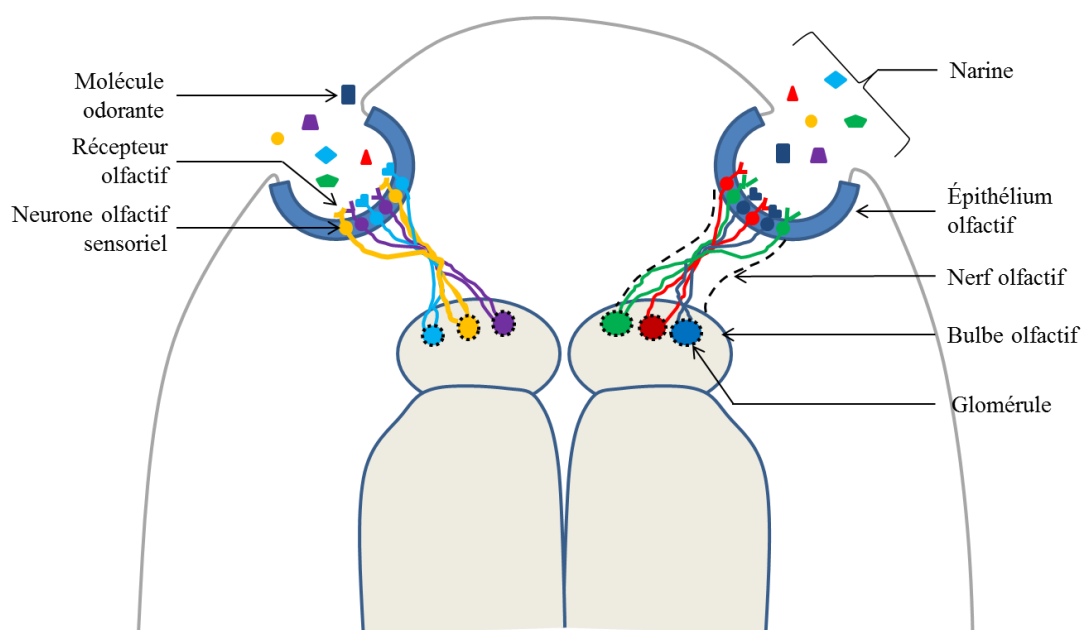


Figure 67 Organisation du système olfactif chez les Téléostéens. Schéma en vue dorsale, antérieure en haut. D'après (Lledo and Gheusi, 2003; Moorman, 2001).

Initialement, il a été supposé que l'olfaction n'était pas modifiée chez les formes cavernicoles. Cette conclusion se basait sur une étude histologique de l'épithélium olfactif, qui forme des replis (ou lamelles) dans la narine. Le nombre de lamelles était le même voire plus faible chez les CF Pachón et Los Sabinos que chez les morphotypes de surface (Schemmel, 1967).

Cependant, il est visible en morphologie externe que l'ouverture des narines chez l'adulte CF est plus large que chez le SF (Wilkins, 1988). Plus récemment, il a été découvert que le nombre de nouveaux interneurons GABAergiques arrivant dans le bulbe olfactif depuis le sous-pallium est augmenté chez les CF Pachón (Menuet et al., 2007, **Fig 68**). Or les interneurons à GABA chez les Mammifères ont un rôle dans la discrimination olfactive (Lledo et al., 2004). Cette découverte suggère que la modalité olfactive pourrait être augmentée chez les CF.

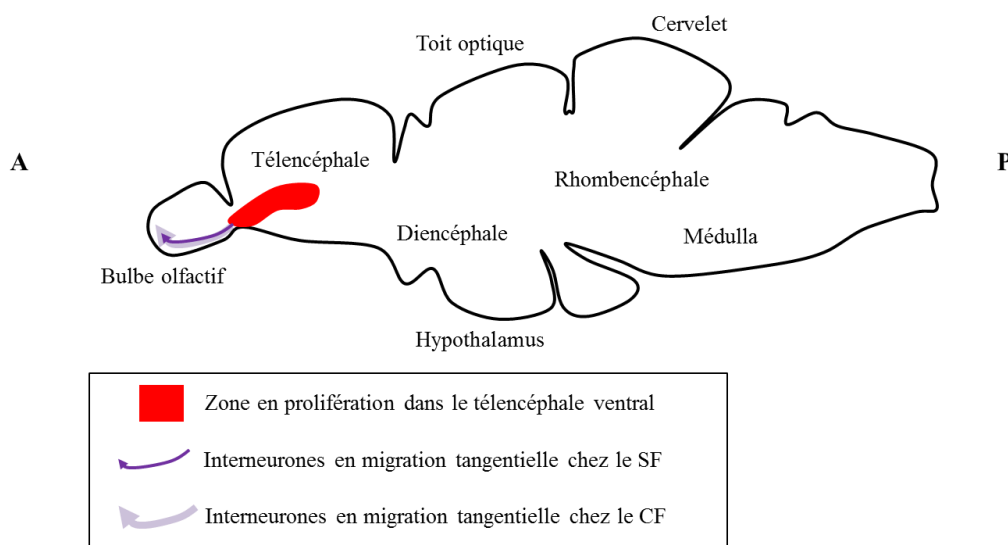


Figure 68 Augmentation du nombre d'interneurones olfactifs chez *Astyanax mexicanus* CF Pachón. D'après (Grandel et al., 2006; Menuet et al., 2007).

La sensibilité aux acides aminés dissouts dans l'eau est en effet meilleure chez les CF Pachón que chez les SF (Protas et al., 2008). Une donnée obtenue dans le milieu naturel confirme également l'hypothèse d'une meilleure chimioréception : dans la grotte Subterraneo, où l'on trouve des poissons troglomorphiques mais aussi des hybrides issus de croisements avec des individus de surface, les *Astyanax* les plus troglomorphiques (sans yeux et dépigmentés) détectent mieux les odeurs liées à la nourriture que les autres (Bibliowicz, Alié et al., 2013). De façon saisissante, l'ouverture des narines est beaucoup plus large chez les plus troglomorphiques.

Plusieurs modalités sensorielles sont donc modifiées chez les *Astyanax* cavernicoles. Certaines semblent tout de même inchangées : les capacités auditives ne sont apparemment pas modifiées (Popper, 1970).

3. Modifications comportementales

Les *Astyanax* cavernicoles ont développé des comportements différents des SF. Nombre de ces comportements ont un lien avec la recherche de la nourriture. Ils correspondent probablement à des adaptations au milieu cavernicole, où la nourriture est supposée rare (Barr, 1968).

L'un des premiers comportements originaux décrits chez les cavernicoles correspond à la façon dont les CF des grottes Pachón, Piedras, Yerbaniz et Los Sabinos cherchent la nourriture sur le substrat, en adoptant un angle de 55° par rapport au fond et en nageant en cercles (Schemmel, 1980). Les SF, naturellement, attrapent leur nourriture en pleine eau, mais une fois rendus aveugles chirurgicalement, ils adoptent un angle de 90° et piquent la nourriture sur le substrat en nageant sur place. Cette attitude est beaucoup moins efficace que celle des CF naturellement aveugles : dans des expériences de compétition dans le noir pour trouver de la nourriture, les CF sont beaucoup plus efficaces que les SF (Hüppop, 1987). L'origine génétique de cette différence d'angle de nourrissage a été étudiée pour les populations Pachón et Tinaja : 2 QTL majeurs expliquent cette différence chez Pachón, et 1 chez Tinaja (Kowalko et al., 2013a). Ces QTL correspondent à des régions génomiques différentes, ce qui implique que le même phénotype a été obtenu par des mutations différentes dans ces deux grottes au cours de l'évolution.

Un autre comportement, déjà mentionné pour d'autres animaux cavernicoles, aide les CF à trouver la nourriture vivante dans le noir : l'attraction pour les vibrations qu'elle provoque. Ce comportement a été remarqué pour la première fois lors de la description de la grotte Chica (Hubbs and Innes, 1936). Il a été décrit plus en détail récemment et appelé VAB (Vibration Attraction Behavior) (Yoshizawa et al., 2010). Le VAB est présent chez les individus des grottes Pachón, Los Sabinos et Piedras. Il repose sur la fonction des neuromastes situés sur l'orbite de l'œil (Yoshizawa et al., 2012). C'est un comportement adaptatif dans les grottes, il permet de trouver la nourriture vivante plus efficacement dans le noir (Yoshizawa et al., 2010, **Fig 69**). En revanche, il est probable que ce comportement est très désavantageux dans les rivières où les prédateurs sont nombreux et provoquent eux aussi des vibrations.

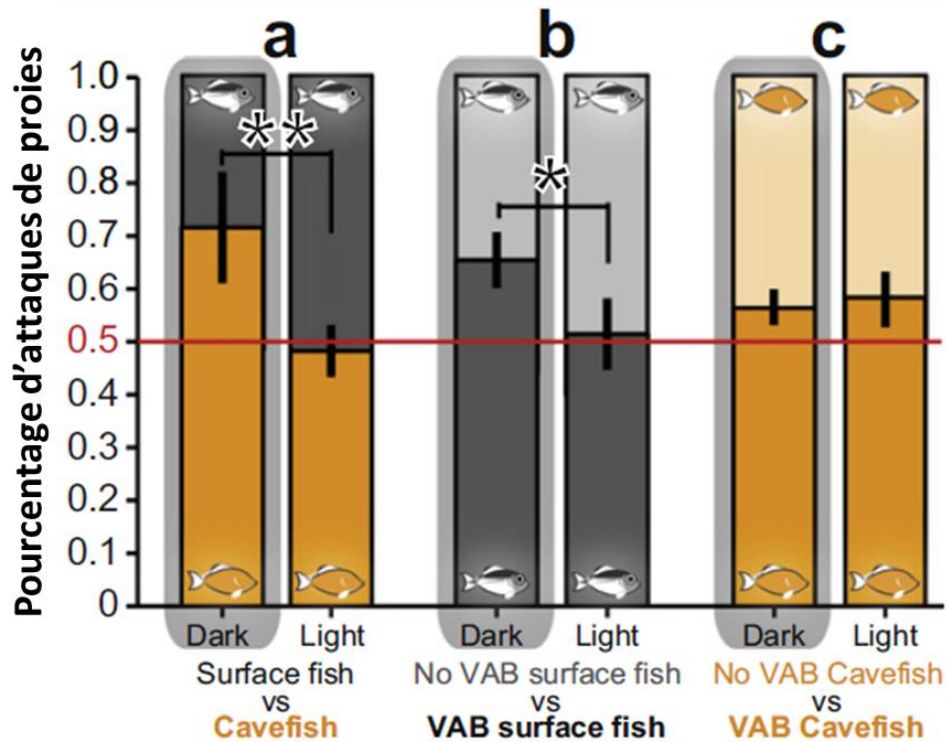


Figure 69 Avantage sélectif du comportement d'attraction pour les vibrations. Expériences de compétition pour la capture de proies à l'obscurité ou à la lumière, entre 2 poissons (SF / CF, SF sans VAB / SF avec VAB, ou CF sans VAB / CF avec VAB) pendant 1 minute. Le nombre d'attaques de proies est compté. Dans le noir, les CF ont un avantage sur les SF pour trouver les proies, et les SF avec VAB ont un avantage sur les SF sans VAB. D'après (Yoshizawa et al., 2010).

D'autre part, les CF Pachón ont un noyau sérotoninergique paraventriculaire antérieur, situé dans l'hypothalamus, plus gros que celui des SF (Elipot et al., 2013). Or il semble que ce noyau contrôle la motivation à la recherche de nourriture chez les CF, et que les CF soient en effet plus motivés par la recherche de nourriture (Elipot et al., 2013).

Les CF des grottes Pachón, Tinaja, et Molino ont réduit leur temps de sommeil de manière importante (Duboué et al., 2011). Des études pharmacologiques ont montré que le blocage des récepteurs beta 1 adrénergiques ou des récepteurs NMDA pouvait rétablir le sommeil chez les CF Pachón (Duboué et al., 2012). Il a été montré par ailleurs que le taux de noradrénaline dans le cerveau des CF Pachón était augmenté (Bilandžija et al., 2013; Elipot et al., 2014), ce qui pourrait être la cause de cet éveil plus long.

Comme les Molino sont issus de la vague récente d'invasions de grottes, alors que les Tinaja et les Pachón sont issus de la première vague d'invasions, la réduction du temps de sommeil a dû apparaître de façon convergente au moins deux fois indépendamment. Cela suggère qu'il pourrait s'agir d'une

adaptation au milieu cavernicole. Le temps de veille étant plus long, les CF pourraient-ils passer plus de temps à la recherche de nourriture ?

Un autre comportement est fortement réduit chez les CF, c'est le comportement agressif qui permet l'établissement d'une hiérarchie chez les SF (Elipot et al., 2013). Le comportement agressif des SF dépend d'un faible taux de sérotonine dans le raphé. Or chez les CF Pachón, ce taux est élevé (Elipot et al., 2013). L'agressivité a un coût énergétique important, particulièrement en cas de blessures, et il est possible que la perte de ce comportement dans un milieu pauvre en ressources soit avantageuse.

L'agressivité est souvent liée à l'établissement d'une hiérarchie dans le banc. Or les CF Tinaja, Pachón et Molino ne nagent pas en banc (Kowalko et al., 2013b). Le comportement de nage en banc est diminué chez les SF lorsqu'ils sont traités avec un inhibiteur de la monoamine oxydase, une enzyme qui dégrade spécifiquement la sérotonine chez l'*Astyanax* (Elipot et al., 2013). Cela suggère que c'est l'augmentation du taux de sérotonine qui pourrait expliquer la perte de la nage en banc chez les CF Pachón. Chez les Tinaja, il s'agirait d'un caractère polygénique, partiellement indépendant de la vision, et qui dépendrait principalement d'un QTL unique (Kowalko et al., 2013b).

4. Modifications métaboliques

Les études les plus anciennes sur le métabolisme des CF Pachón ont montré qu'ils consommaient autant d'oxygène par unité de poids que les SF de manière générale (Wilkins, 1988). Leur contenu en graisse est de 37%, contre 9% pour les SF. Comme la graisse a un métabolisme assez faible comparé à d'autres tissus, la consommation d'oxygène par individu des CF est plus faible que celle des SF. En cas de jeûne, ils perdent moins de poids (Wilkins, 1988).

Une étude plus récente réalisée sur des *Astyanax* achetés dans le commerce a donné des résultats différents. Le taux de glycogène des CF a été mesuré plus élevé que chez les SF et leur taux de triglycérides plus faible, de manière surprenante. Pendant une période de jeûne, ils perdent autant de poids que les SF et consomment significativement plus de réserves (du glycogène, des triglycérides et des protéines) que les SF. Ils activent davantage les voies métaboliques de compensation (formation d'acides cétoniques par cétoxygénèse et synthèse de glucose à partir d'acides aminés ou de lipides par gluconéogenèse) et se remettent moins bien de cette période de privation (Salin et al., 2010). Les différences observées pourraient être liées à la différence de provenance des CF : ici, il n'y a aucune indication sur leur grotte d'origine, il pourrait s'agir d'une autre population que Pachón.

c. Perte de l'œil

1. Descriptions des défauts de l'œil de l'*Astyanax cavernicole*

Les populations CF d'*Astyanax* sont aveugles, et les adultes ont un œil très réduit voire invisible à l'œil nu (Jeffery, 2009). Cependant, les embryons CF commencent par développer un œil. Des études en microscopie électronique ont montré que dès 2 dpf, l'œil de CF Chica commence à se réduire, la rétine montrant des signes d'apoptose, puis l'œil est progressivement internalisé (Zilles et al., 1983). La réduction est variable : les CF des grottes Pachón, Curva et Los Sabinos ont des yeux vestigiaux plus petits que ceux des CF Molino et Subterraneo (Jeffery, 2009).

La population la plus étudiée est Pachón. Les couches de la rétine du CF Pachón sont désorganisées, et ne contiennent que peu de bâtonnets exprimant la rhodopsine (Yamamoto and Jeffery, 2000). Les segments externes des photorécepteurs sont désorganisés (Langecker et al., 1993). Le toit optique est réduit chez les Pachón : grâce à des coupes sériées, il a pu être établi que son volume était réduit de 50 à 60% par rapport aux SF et qu'il comportait 80% de neurones en moins (Soares et al., 2004). Ces données suggèrent fortement que l'œil vestigial de Pachón est non fonctionnel.

Toutes ces données sont obtenues sur des CF élevés en laboratoire, à la lumière. Il faut cependant noter que dans les grottes, en l'absence de lumière, la régression de l'œil doit être encore plus importante. En effet, des larves Pachón de 30 dpf élevées à l'obscurité ont des yeux beaucoup plus petits que leurs congénères élevées à la lumière (Romero Díaz, 2009, **Fig 70**).

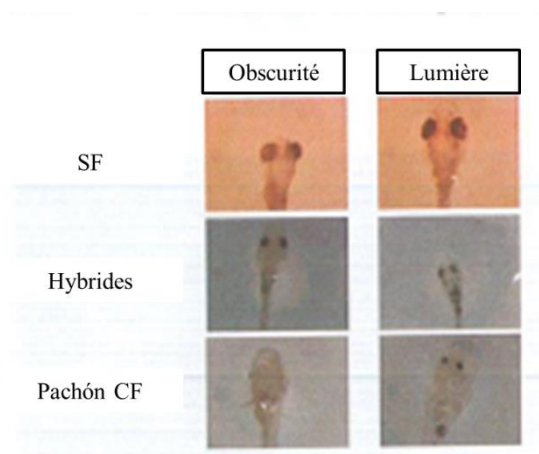


Figure 70 Développement de l'œil chez *Astyanax mexicanus* à la lumière et à l'obscurité. Photographies de la tête des larves, antérieur en haut. D'après (Romero Díaz, 2009).

Autre point important : même en l'absence d'yeux fonctionnels, les CF sont capables de détecter certains stimuli visuels, probablement grâce à des photorécepteurs extraoculaires. Ainsi, lorsqu'ils sont placés dans une enceinte circulaire avec des bandes lumineuses en rotation sur la paroi, ils adaptent leur vitesse de nage au déplacement des bandes lumineuses (Teyke and Schaerer, 1994). Leur réponse est robuste même pour des intensités lumineuses de 20 lux, et pour des bandes lumineuses d'environ 2 mm de largeur, et même après extirpation de l'œil vestigial.

2. Origine développementale

L'œil commence par se développer chez l'*Astyanax* cavernicole : le champ de l'œil (la future rétine) exprime *Pax6* à 10 hpf à la fin de la gastrulation (Strickler et al., 2001), des vésicules optiques se forment et expriment *Pax6* (Behrens et al., 1997; Strickler et al., 2001), tandis que la tige optique exprime correctement *pax2* (Yamamoto et al., 2004). Tout au long du développement de l'œil, *Pax6* continue à être exprimé par la rétine et le cristallin de façon normale chez les CF Pachón (Behrens et al., 1997; Strickler et al., 2001). L'expression de *Prox1* chez les CF Pachón, Los Sabinos et Chica dans la rétine et le cristallin est normale de 24 hpf à 96 hpf (Jeffery et al., 2000). A l'éclosion, les larves CF sont dotées d'yeux apparemment bien formés même s'ils sont plus petits que ceux des SF (Cahn, 1958). La signalisation, la régionalisation dorso-ventrale et la prolifération dans la rétine, jusqu'à la formation des couches de la rétine, sont normales chez le CF Pachón (Alunni et al., 2007). La morphogenèse de l'œil s'effectue normalement chez les CF Piedras (Langecker et al., 1993).

Cependant, le champ de l'œil est réduit antérieurement chez les CF Pachón, Curva et Los Sabinos et il est clairement séparé en deux au niveau de la ligne médiane (Strickler et al., 2001). Plus tard, les vésicules optiques sont réduites chez ces CF (Strickler et al., 2001; Yamamoto et al., 2004). Au contraire, la zone d'expression de *Pax2*, correspondant à la future tige optique, est élargie (Yamamoto et al., 2004). La cornée des CF n'exprime jamais *Pax6*, alors que l'expression de ce gène fait partie de la différenciation normale de la cornée, induite par le cristallin (Strickler et al., 2001).

i. Rôle du cristallin

La première structure qui dégénère est le cristallin : à 25hpf, des cellules apoptotiques sont visibles dans le cristallin et l'épithélium superficiel qui le recouvre chez les CF Chica et Pachón (Jeffery and Martasian, 1998, **Fig 71**). Cet épithélium présente également des cellules apoptotiques chez le SF, et chez le poisson-zèbre (Greiling et al., 2010) : à ce stade, l'apoptose dans ce tissu permettrait le réarrangement de l'épithélium du cristallin en une seule couche cellulaire.

L'apoptose préférentielle dans le cristallin de CF à ce stade n'est donc pas très nette, mais elle s'amplifie : à 48 hpf, il n'y a aucune cellule apoptotique dans le cristallin de SF, mais il y en a beaucoup dans le cristallin de CF Pachón (Alunni et al., 2007; Yamamoto and Jeffery, 2000), et un marquage Lysotracker suggère que cela soit vrai dès 40 hpf (Alunni et al., 2007).

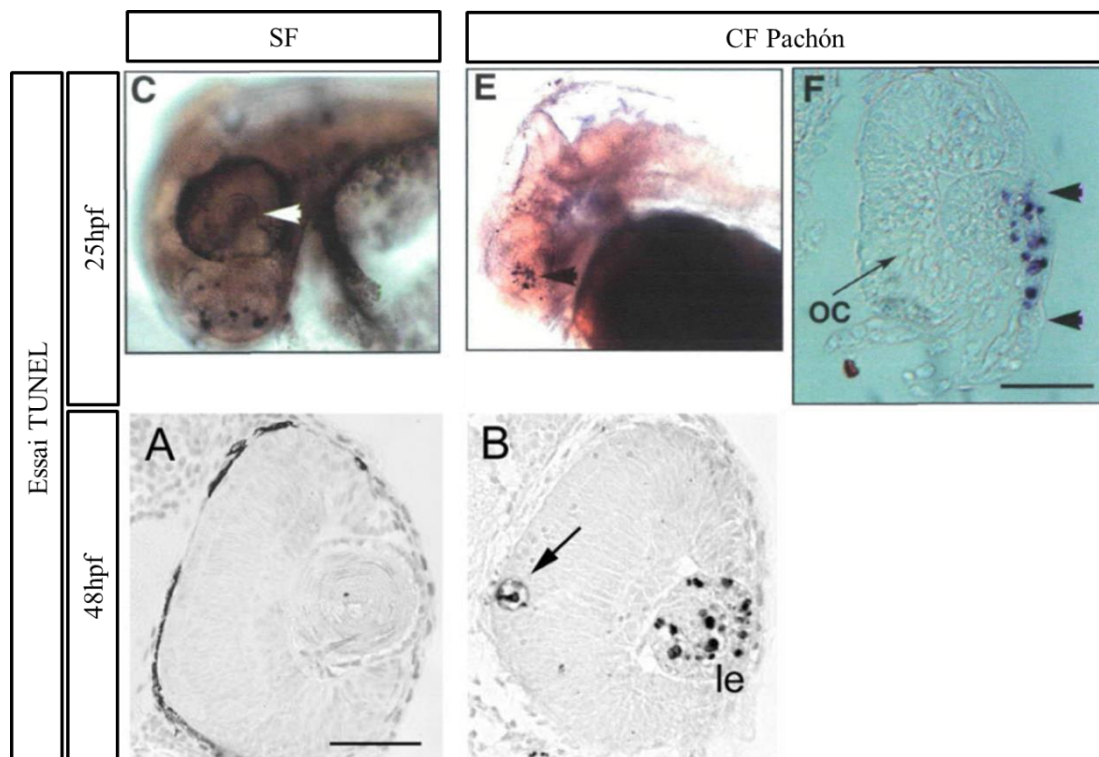


Figure 71 Apoptose dans le cristallin chez *Astyanax mexicanus* CF Pachón. Vues latérales à 25 hpf (antérieur en bas à gauche), et coupe transversale à travers l'œil de CF. A 48 hpf, coupes transversales. D'après (Alunni et al., 2007; Jeffery and Martasian, 1998).

Dans la rétine, l'apoptose commence à 48 hpf (Alunni et al., 2007). Elle reste importante à 3 dpf et 5 dpf, puis ce sont des cellules isolées qui continuent à entrer en apoptose tout au long de la vie (Strickler et al., 2007a). L'épithélium pigmenté de la rétine subit aussi une vague d'apoptose entre 5 et 10 dpf (Strickler et al., 2007a). La zone marginale ciliaire (CMZ) et la couche nucléaire externe prolifèrent normalement chez le CF (Alunni et al., 2007), mais les nouvelles cellules meurent au lieu de s'incorporer dans la rétine (Strickler et al., 2007a).

Le cristallin a une importance toute particulière dans la dégénérescence de l'œil du CF Pachón. Ainsi, la transplantation d'un cristallin de CF à une larve SF à 24 hpf suffit à faire dégénérer l'œil du poisson de surface : l'œil ne développe ni pupille, ni chambre antérieure, ni cornée ni iris, la rétine est

petite et « tordue » mais bien formée de couches reconnaissables, et l'œil est recouvert d'un tégument (Yamamoto and Jeffery, 2000). Au stade de la transplantation, les signaux de l'environnement ne peuvent donc pas empêcher le cristallin de CF d'entrer en apoptose, le phénomène d'apoptose est autonome au cristallin. Et de plus, un cristallin apoptotique suffit à faire dégénérer l'œil entier.

A l'opposé, la transplantation d'un cristallin de SF dans l'œil d'une larve CF Pachón suffit à empêcher l'apoptose dans la rétine (Yamamoto and Jeffery, 2000), et à permettre la survie d'un œil avec une chambre antérieure, un iris et une cornée. A ce stade, les signaux de la rétine CF ne suffisent donc pas à faire entrer le cristallin en apoptose. Et sans un cristallin apoptotique, l'œil de CF ne dégénère pas.

Les mêmes expériences de transplantation chez les CF Los Sabinos ont donné les mêmes résultats : dans cette population également, c'est le cristallin défectueux qui entraîne la dégénérescence de l'œil entier (Jeffery, 2003).

Les CF transplantés voient-ils ? L'œil est-il complètement restauré ? Les couches de la rétine sont bien organisées avec notamment une couche de bâtonnets, la zone de prolifération (CMZ) exprime bien PCNA, Pax6 et Prox1 et semble donc active proliférativement (Yamamoto and Jeffery, 2000). La cornée exprime Pax6 correctement (Yamamoto and Jeffery, 2000). Les projections rétino-tectales sont présentes aussi, et le nerf optique d'un œil de CF restauré serait plus gros que celui d'un CF classique (Romero et al., 2003; Soares et al., 2004). La rétine ne serait pas apoptotique chez ces poissons, et les cellules produites par la CMZ s'incorporent correctement dans la rétine (Strickler et al., 2007a). Le toit optique est 13% plus volumineux et il comporte 8% de neurones en plus (Soares et al., 2004).

Mais les CF transplantés seraient sans réponse vis-à-vis de la lumière, contrairement aux SF qui sont scotophiles, et les signaux d'électrorétinogramme du côté de l'œil induit seraient faibles (Romero et al., 2003). L'apoptose reste importante dans la RPE (Strickler et al., 2007a). Même la restauration de la rétine n'est pas acceptée par toute la communauté : ainsi Wilkens argumente que l'expression d'opsines par la rétine n'est pas suffisante pour la déclarer restaurée puisque les CF de la grotte Piedras, qui ont un œil réduit, expriment des opsines également (Wilkens, 2010). Il s'agirait donc d'une restauration morphologique, mais pas fonctionnelle, de l'œil.

Pour interpréter ces résultats, on peut imaginer soit que le cristallin envoie normalement des signaux de survie à la rétine (et que chez le CF, l'apoptose du cristallin empêche la diffusion de ces signaux), soit que le cristallin apoptotique de CF envoie des signaux « de mort » à la rétine. D'après les auteurs, l'ablation du cristallin chez les larves SF aboutirait au même phénotype de dégénérescence que la transplantation d'un cristallin CF (Yamamoto and Jeffery, 2000). Cela suggérerait donc que le problème chez les CF serait plutôt un défaut de signaux de survie. Cependant, une étude ultérieure montre que l'ablation du cristallin de SF conduit à l'internalisation de l'œil et à son englobement par

la RPE, et à l'absence de cornée, mais pas à davantage d'apoptose ou à un défaut d'incorporation des cellules prolifératives dans la rétine (Strickler et al., 2007a). D'ailleurs, chez le poisson-zèbre, l'ablation du cristallin ne provoque pas de défauts dans la rétine (Semina et al., 2006).

De même, l'œil de SF transplanté par un cristallin CF n'est pas complètement dégénéré, la rétine notamment étant beaucoup mieux formée que chez un CF (Yamamoto and Jeffery, 2000). Les auteurs concluent qu'une autre composante de l'œil de CF (en dehors du cristallin) doit être défectueuse, et que c'est seulement lorsque le cristallin et cette 2^e structure sont défectueuses que la rétine entre en apoptose (Strickler et al., 2007a). Vu la présence d'apoptose dans la RPE du CF (Strickler et al., 2007a), et le fait que cette structure semble importante pour la morphogenèse et la lamination de la rétine (Raymond and Jackson, 1995), cette structure pourrait être la meilleure candidate (**Fig 72**).

Il est important de noter ici que, chez l'*Astyanax* comme chez le poisson-zèbre, le cristallin n'est pas capable de régénérer après ablation complète, contrairement à celui du triton (Eguchi et al., 2011; Suetsugu-Maki et al., 2012).

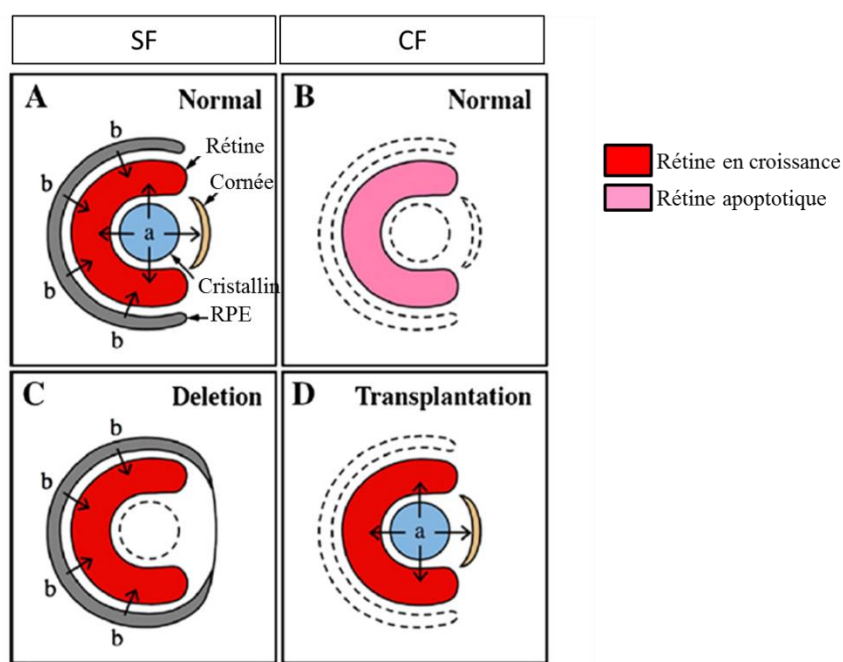


Figure 72 Modèle proposé pour expliquer l'apoptose dans la rétine de *Astyanax mexicanus* CF Pachón. D'après (Strickler et al., 2007a).

Cependant, le rôle majeur du cristallin dans la dégénérescence de la rétine est contesté par Wilkens : en observant les descendants F2 d'un croisement entre des SF et des Pachón, aucune corrélation entre le degré de développement du cristallin et de la rétine n'est observée (Wilkens, 2007). Pour cet auteur, le développement du cristallin et de la rétine est donc indépendant. Il explique cette

différence de conclusion par le fait que les Pachón étudiés par Jeffery ont été collectés récemment dans la grotte, après un événement d'hybridation avec des SF dans les années 1970. Au contraire, les Pachón du laboratoire de Wilkens ont été collectés avant cette hybridation et auraient donc un phénotype plus drastique (Wilkens, 2007). Cependant, il faut noter que l'importance du cristallin n'a pas été remarquée par Jeffery seulement pour la population Pachón, mais aussi pour Los Sabinos (Jeffery, 2003). Et de plus, les données obtenues par Wilkens sur les hybrides concernent la taille de la rétine et du cristallin, et pas leur entrée en apoptose.

Quels sont donc les défauts inhérents au cristallin de CF ? Son premier défaut est sa taille, plus petite que celui de SF. A 25 hpf, il exprime bien *Pax6* mais à des niveaux plus faibles que le SF (Jeffery and Martasian, 1998). De 24 à 96 hpf, le cristallin CF exprime également le gène de différenciation *Prox1* correctement (Jeffery et al., 2000). Les gènes de canaux transporteurs d'eau MIP et MP19 sont également exprimés correctement (Strickler et al., 2007b).

La différenciation terminale du cristallin implique l'expression à haut niveau de protéines structurales, les cristallines, qui permettent au cristallin d'acquérir sa transparence (Vihtelic, 2008). Parmi ces cristallines, certaines sont exprimées correctement : ainsi une cristalline de la famille gamma M (en fait plus précisément de la famille gamma M2d) est exprimée correctement dans le cristallin de CF (Jeffery et al., 2000, **Fig 73**). Une immunohistochimie anti cristalline gamma M montre que la protéine est exprimée également dans le cristallin de CF Pachón à 2 et 3 dpf (Strickler and Jeffery, 2009). Ceci n'est pas très étonnant, car les cristallines de la famille gamma sont supposées être sous le contrôle du facteur de transcription *Prox1*, en tous cas chez la souris (Wigle et al., 1999), et *Prox1* a une expression inchangée chez le CF Pachón. Une cristalline de la famille beta B1 (en fait *crybb1d*) est exprimée normalement aussi (Strickler et al., 2007b, **Fig 73**).

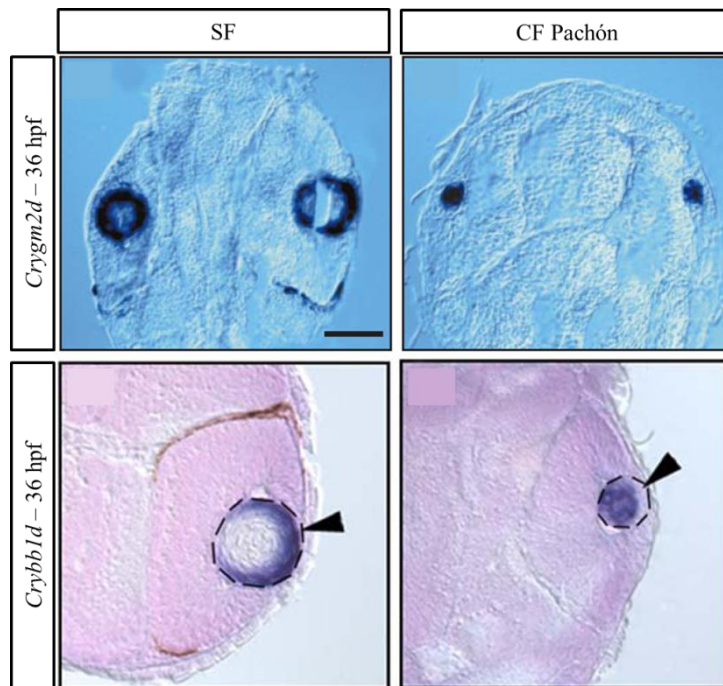


Figure 73 Expression de 2 cristallines chez des larves de *Astyanax mexicanus*. Hybridation *in situ* de *crygm2d* et *crybb1d*. Coupes transversales. D'après (Jeffery et al., 2000; Strickler et al., 2007b).

En revanche, l'expression de la cristalline alpha A est extrêmement réduite chez le CF Piedras (Behrens, 1998), ainsi que chez le CF Pachón (Strickler et al., 2007b, **Fig 74**). Or cette cristalline a un rôle anti-apoptotique : la transfection de cette cristalline dans une lignée cellulaire de cristallin de souris *cryaa*^{-/-} et *cryab*^{-/-} protège contre l'apoptose induite par des composés pharmacologiques, dans des proportions beaucoup plus importantes que la transfection de *cryab* (Andley, 2000). Il est donc possible que la simple absence de cette molécule anti-apoptotique chez le CF puisse provoquer la mort des cellules du cristallin.

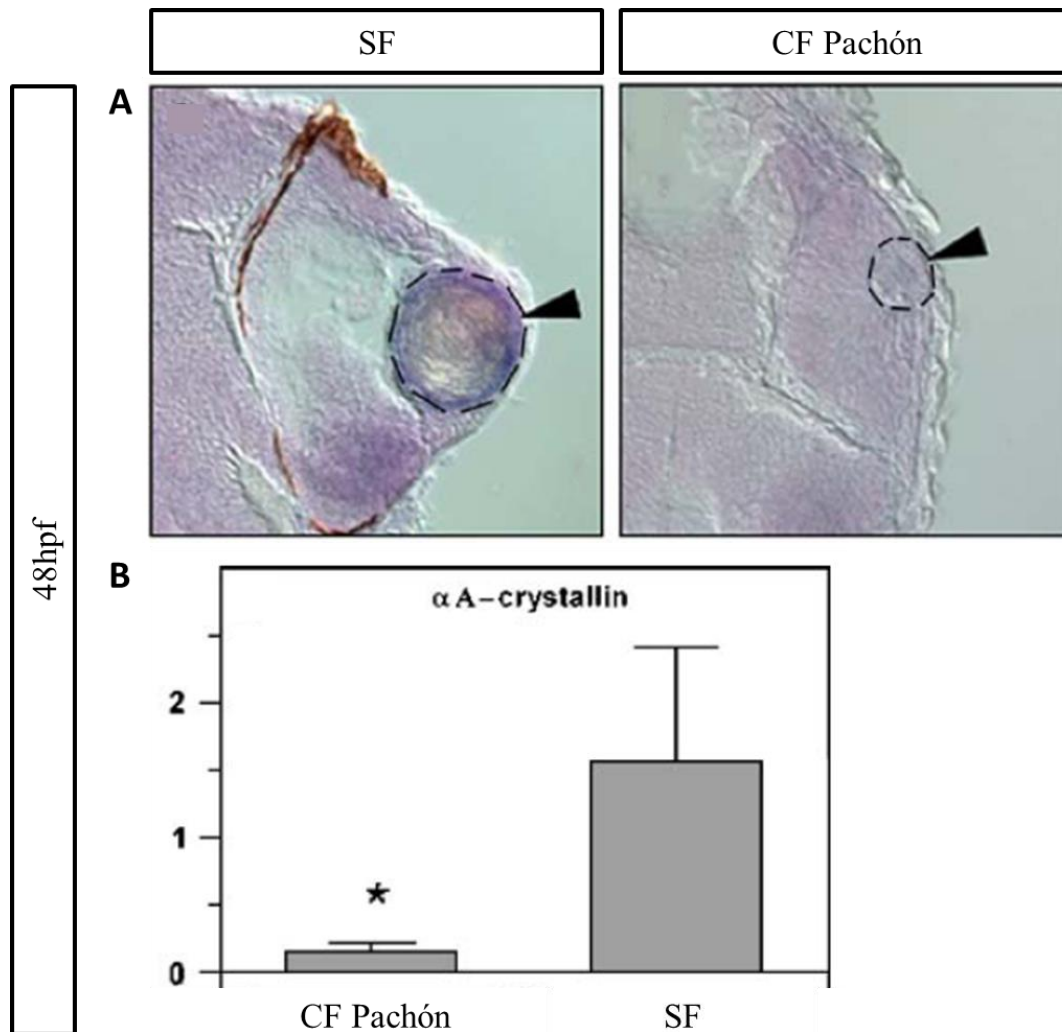


Figure 74 Réduction de l'expression de *cryaa* dans le cristallin de *Astyanax mexicanus* CF Pachón à 48hpf. **A** Hybridation *in situ* *cryaa*. **B** Niveau relatif d'ARNm *cryaa* d'après une expérience de RT-qPCR. D'après (Strickler et al., 2007b).

Chez les CF Piedras, c'est la cristalline gamma S qui est absente du cristallin (Langecker et al., 1995).

La molécule chaperonne *hsp90α*, qui aide au repliement de protéines impliquées dans des voies de transduction du signal, est exprimée dans le cristallin des CF Chica, Tinaja et Pachón de 24 à 48 hpf, et pas chez le SF (Hooven et al., 2004). Cela pourrait aussi être une explication à l'entrée en apoptose du cristallin CF. D'ailleurs, l'inhibition de la fonction de *hsp90α* par des traitements pharmacologiques chez le CF Pachón diminue l'apoptose dans le cristallin (Hooven et al., 2004).

D'autres cristallines sont apparemment moins exprimées chez les CF Pachón que chez les SF à 3dpf, d'après une étude basée sur une puce ADN de poisson-zèbre : une cristalline gamma B, une

cristalline gamma M4 et une cristalline gamma M2c (Strickler and Jeffery, 2009). Cependant, cette étude a 2 défauts : tout d'abord, comme c'est l'ARN total des larves qui est extrait, et comme le cristallin est plus petit chez les CF à ce stade, il y a forcément un biais pour que tous les gènes du cristallin soient moins exprimés. D'autre part, comme la puce comporte des séquences de poisson-zèbre, l'hybridation avec les sondes d'*Astyanax* ne peut pas être parfaite, et il est très probable que les orthologies déduites de ces hybridations, particulièrement pour les familles multigéniques, soient fausses.

Une étude à grande échelle récente a apporté d'autres données : le séquençage par la méthode Roche/454 du transcriptome adulte de CF Pachón et de SF a permis de comparer les niveaux d'expression de nombreux gènes chez l'adulte (Gross et al., 2013). Ainsi, d'après cette étude, plusieurs cristallines seraient absentes chez le CF adulte : *crygs1*, *crygm1*, *crygs4*, *crygm3*, *crybb2*, *crygm2e*, *cryba2a*, et *cryba1a*. Cependant, ces annotations proviennent d'un simple BLAST contre le transcriptome de poisson-zèbre, donc l'orthologie exacte de ces gènes est loin d'être assurée. Et de plus, chez l'adulte CF, le cristallin (et même l'œil) est quasi-absent, il est donc très logique d'imaginer que la plupart des cristallines ne sont pas exprimées. Ainsi, de manière plus générale, les gènes impliqués dans la fonction visuelle sont moins exprimés chez les CF, d'après une étude d'enrichissement en ontologies de gènes (Gross et al., 2013).

ii. Quadrant ventral de la rétine

Outre l'apoptose dans le cristallin, l'œil de CF Pachón a un autre défaut : il manque une partie de la rétine, son quadrant ventral (Pottin et al., 2011; Yamamoto et al., 2004). Cette partie de la rétine dérive chez le SF de la partie postérieure et médiane de la plaque neurale antérieure, à 11 hpf. Or cette même région de l'embryon, chez le CF Pachón, donne naissance à d'autres parties du cerveau, et surtout à l'hypothalamus (Pottin et al., 2011). Les destinées de cette partie de la plaque neurale sont donc différentes chez les deux types d'embryons, et la destinée « rétine ventrale » est absente chez le CF. Or, dès 10 hpf, cette région semble avoir une identité différente chez le CF : en effet, chez le SF, toute la plaque neurale antérieure, dont la partie postérieure et médiane qui donne le quadrant ventral de la rétine, exprime *Lhx2*, un facteur de transcription à LIM-homéodomaine impliqué dans le développement de l'œil (Yun et al., 2009). Au contraire, chez le CF, la région postérieure et médiane n'exprime pas *Lhx2* (Pottin et al., 2011, [Fig 75](#)).

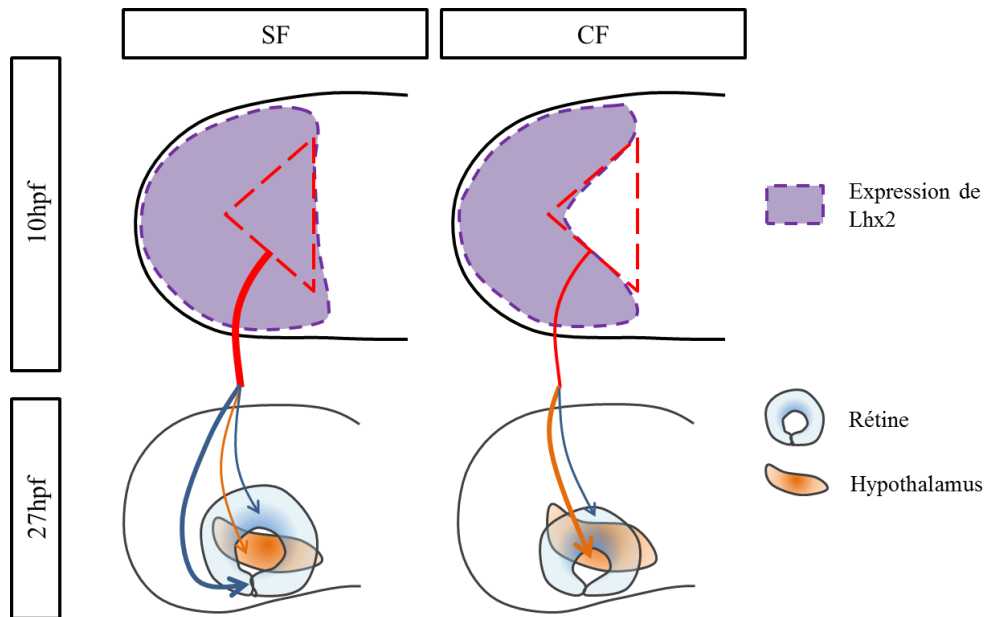


Figure 75 Carte de devenir présomptif de la partie postérieure et médiane de la plaque neurale antérieure chez *Astyanax mexicanus* SF et CF Pachón. Le schéma à 10 hpf montre la plaque neurale en vue dorsale (antérieur à gauche). Celui à 27 hpf montre la tête des embryons en vue latérale (antérieur à gauche). Les flèches indiquent le devenir des cellules du triangle rouge (partie médiane postérieure de la plaque neurale antérieure) par leur couleur orange ou bleue, et la proportion de cellules pour chaque devenir par leur épaisseur. D'après (Pottin et al., 2011).

iii. Signalisation précoce

La régionalisation précoce de la plaque neurale est sous le contrôle de différents morphogènes, des molécules de signalisation qui permettent de « dessiner » les grandes subdivisions du futur cerveau (voir partie BII sur le développement du cristallin).

Certains de ces morphogènes ont des expressions modifiées chez le CF, ce qui explique en partie les modifications importantes du cerveau et de l'œil.

La première voie de signalisation dont la modification a été observée est la voie Hedgehog (Hh). En effet, chez les CF Pachón, Chica et Los Sabinos, à la fin de la gastrulation, vers 10 hpf, l'expression de *sonic hedgehog* (*shh*) à la ligne médiane est étendue latéralement et antérieurement par rapport au SF (Yamamoto et al., 2004, **Fig 76**). De plus, chez Pachón, l'expression de *tiggy-winkle hedgehog* (*twhh*) est également étendue. Or l'injection d'ARNm de *Shh* dans des embryons SF conduit à la réduction des yeux, la perte du quadrant ventral, et la réduction, l'apoptose voire la perte du cristallin, et finalement à la perte de la vision chez l'adulte (Yamamoto et al., 2004). Le traitement à la cyclopatamine de CF Pachón augmente la taille de l'œil et du cristallin, mais ne permet pas de « sauver » l'œil du CF. L'effet très important de *Shh* sur le cristallin a été vérifié par des expériences

de transplantation : si un cristallin d'un SF injecté avec l'ARNm de *Shh* est transplanté dans l'œil d'un SF contrôle, le développement de l'œil s'arrête dans 35% des cas. Au contraire, la transplantation d'un cristallin de SF normal dans l'œil d'un SF injecté avec l'ARNm de *Shh* conduit à la restauration de l'œil dans 35% des cas.

L'expansion de *Shh* a d'autres effets que la perte de l'œil chez le CF. En effet, la largeur des mâchoires et le nombre de bourgeons du goût chez le CF Pachón sont sous le contrôle de *Shh* (Yamamoto et al., 2009).

Il est à noter que cette expansion de *Shh* persiste au cours du développement du CF Pachón, jusqu'à 48 hpf, et a des conséquences tout au long du développement du cerveau antérieur et de la région oropharyngée (Menuet et al., 2007; Yamamoto et al., 2009).

Une deuxième voie de signalisation est modifiée chez le CF Pachón, celle du morphogène *Fgf8*. En effet, *Fgf8* est exprimé 2 heures plus tôt dans le télencéphale présomptif, à 10 hpf, chez le CF par rapport au SF (Pottin et al., 2011, **Fig 76**). Cette modification semble liée à celle de *Shh* : en effet, si des CF sont traités avec un inhibiteur de la voie Hedgehog, la cyclopamine, cela inhibe spécifiquement l'expression de *Fgf8* dans le télencéphale. Mais la relation réciproque est vraie : l'inhibition de la voie *Fgf* par le composé SU5402 chez les CF conduit à une réduction du patron d'expression de *Shh*, qui ressemble alors à un patron d'expression de SF. Ce même traitement conduit à une expansion de l'expression de *Fgf8*, ce qui suggère que la voie de signalisation *Fgf* aboutit à l'inhibition de l'expression de *Fgf8*.

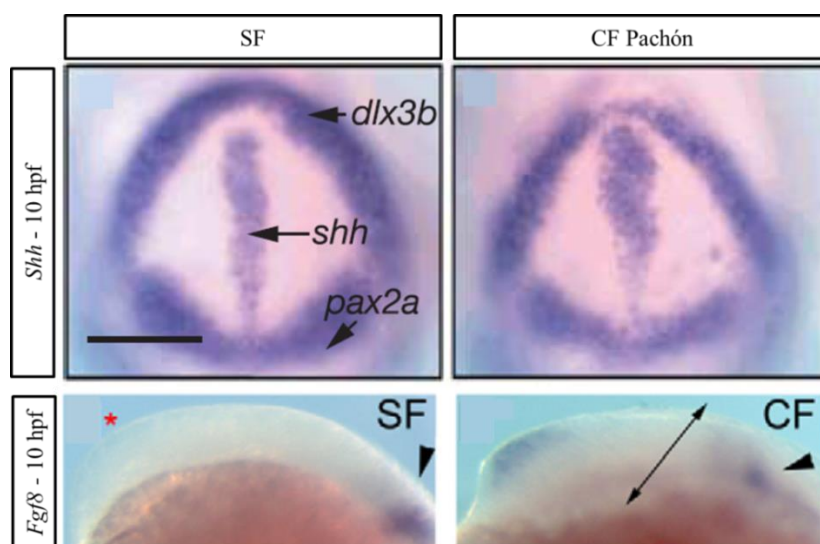


Figure 76 Hybridations *in situ* montrant les modifications d'expression de *Shh* et *Fgf8* entre *Astyanax mexicanus* SF et CF Pachón. Vues dorsales pour *Shh*, antérieur en haut, et vues latérales pour *Fgf8*, antérieur à gauche. Les pointes de flèches indiquent l'expression de *Fgf8* à la frontière cerveau moyen – cerveau postérieur. L'astérisque rouge montre l'absence d'expression de *Fgf8* dans le télencéphale de SF à 10 hpf. D'après (Pottin et al., 2011; Yamamoto et al., 2004).

Quel est l'effet de cette hétérochronie d'expression de *Fgf8* sur le développement de l'œil ? L'inhibition de la signalisation Fgf entre 8 et 12 hpf chez les CF permet de restaurer à la fois l'expression « normale » de *Lhx2* dans la plaque neurale, et le quadrant ventral de la rétine. D'autre part, elle semble aussi diminuer la taille du cristallin (Pottin et al., 2011). On peut donc supposer que l'expression précoce de *Fgf8* chez le CF conduit à la perte du quadrant ventral, mais parallèlement et de façon surprenante, à une augmentation de la taille du cristallin. Ce dernier effet est en contradiction avec des données dans d'autres espèces, chez qui *Fgf8* inhibe la formation du cristallin (Bailey et al., 2006; Nechiporuk et al., 2007).

3. Origine génétique

Les yeux d'hybrides de CF Tinaja/Pachón, d'hybrides Tinaja/Molino ou d'hybrides Pachón/Molino sont plus grands et mieux développés que ceux de chacun des parents. De plus, une partie des hybrides peut voir. Cela suggère qu'au moins certaines des mutations conduisant à la perte de l'œil sont différentes dans différentes grottes (Borowsky, 2008). Vues la fréquence et la distribution des différents phénotypes dans la F1 et la F2 de croisements SF/Pachón, il semble qu'au moins 6 loci soient impliqués dans la perte de l'œil pour cette population (Wilkens, 1988).

Le premier gène dont l'implication a été suspectée est *Pax6*, le gène « maître » du développement de l'œil : sa séquence a été clonée, mais aucune mutation n'a été détectée chez les CF Piedras (Behrens et al., 1997).

La séquence des gènes d'opsines a également été analysée chez les SF, et les CF Pachón et Micos. Il semble que 12 nucléotides manquent dans l'opsine verte de Pachón, ce qui pourrait la rendre non fonctionnelle. Et chez les deux populations CF, il semble y avoir une accumulation de transitions C>T dans les gènes d'opsines, que les auteurs interprètent comme un début de pseudogénisation (Yokoyama et al., 1995). Cependant, pour inférer la direction des changements C>T, les auteurs ont considéré que si l'une des populations portait un allèle par opposition aux deux autres, alors cet allèle était dérivé. Il serait intéressant de confirmer ces données en séquençant les opsines d'un groupe externe. Si les opsines sont réellement en voie de pseudogénisation et non fonctionnelles chez le CF, cela pourrait expliquer l'absence de photoréception chez les CF, même après transplantation d'un cristallin de SF. En revanche, ce type de mutations n'est pas susceptible d'affecter le développement de l'œil.

Plutôt qu'une approche par gènes candidats, plusieurs équipes ont choisi de déterminer les régions du génome affectant la taille de l'œil par des études de QTL. Une première étude sur les CF Pachón s'est basée sur 142 marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, une méthode basée sur

des réactions de PCR avec des amorces aléatoires) coalesçant en 27 groupes de liaison (alors que le nombre de paires de chromosomes attendu est 25). Elle a permis de détecter 3 QTLs pour la taille de l'œil (Borowsky and Wilkens, 2002). L'un de ces QTLs était proche d'un QTL de « condition physique », évaluée par le rapport entre le poids et la taille de l'animal. Ceci était un premier indice que les mutations affectant l'œil pouvaient être pléiotropiques et affecter également des traits constructifs.

Une deuxième étude se basant sur 172 marqueurs microsatellites (coalesçant en 29 groupes de liaison) et 539 individus F2 d'un croisement SF/ Pachón permet de détecter 8 QTLs pour la taille des yeux, et 6 pour la taille du cristallin, dont certains sont proches (Protas et al., 2007). 6 QTL affectant la taille des yeux affectent aussi des traits constructifs comme le nombre de dents maxillaires ou de bourgeons du goût. Aucun QTL pour la taille des yeux n'est localisé à proximité de *shh*, *twhh* ou *pax6*.

La suite de cette étude, basée sur la même carte, montre que les associations de QTL sont fréquentes (Protas et al., 2008). Par exemple, le groupe de liaison LgP27 comporte des QTLs pour la position de la nageoire dorsale, la condition physique et la taille de l'œil, le groupe de liaison LgP5 affecte le nombre de côtes, la taille de l'os suborbital SO3 et celle de l'œil, le groupe de liaison LgP7 affecte le nombre de dents maxillaires, la taille de l'os SO3 et celle de l'œil, et le groupe de liaison LgP13 affecte le nombre de dents maxillaires, la position de la nageoire dorsale, l'épaisseur du pédoncule caudal et la taille de l'œil.

Une avancée importante a été réalisée la même année, quand une carte de liaison ancrée sur le génome du poisson zèbre a été réalisée : cette carte, formée de 28 groupes de liaison, et réalisée suite à des croisements SF / Pachon, SF / Tinaja et SF/ Molino, a été ancrée sur le génome de poisson zèbre en recherchant les blocs de synténie par BLAST des séquences flanquant les marqueurs. Cette carte permet de prédire la position de gènes chez l'*Astyanax*. Ainsi, parmi les QTLs affectant la taille des yeux, l'un est probablement proche du gène de la cristalline αA , ce qui fait de cette cristalline un bon gène candidat pour être muté chez les CF, d'autant plus que son expression est réduite chez les CF Pachón (Gross et al., 2008; Strickler et al., 2007b). Un autre est probablement proche de *Rom1*, un gène impliqué dans la structure des bâtonnets, et dont la mutation chez l'Homme provoque une dégénérescence maculaire.

Le principe d'ancrage des marqueurs sur le génome du poisson zèbre a été repris dans une étude QTL récente sur l'épaisseur des différentes couches de la rétine (O'Quin et al., 2013). Cette étude a permis de détecter un QTL affectant l'épaisseur de la couche ganglionnaire (a priori proche de *crygm2c*, *sox1a*, *dlx1a* et *dlx2a*), un autre pour la couche nucléaire interne et la taille du cristallin (proche des gènes candidats *crx*, *isl1*, *rasgef1b*, *lhx1*, *rom1a*, *tbx2a* et *cryabb*), un autre pour la couche plexiforme externe et la taille de l'œil (proche des gènes *lhx2*, *nefma*, *myo7a* et *tulp1*), et un dernier

pour la couche nucléaire externe (proche des gènes *prph2a*, *fascn2b*, *pde6g*, *rab18a* et *six3b*). Cette approche est donc très puissante pour détecter des gènes candidats impliqués dans la dégénérescence de l'œil chez le CF.

Récemment, une autre avancée importante a été due à une étude QTL qui cherchait l'origine génétique du comportement d'attraction pour les vibrations (VAB) des CF Pachón : il a été montré dans cette étude que deux régions du génome regroupaient des QTL pour la taille de l'œil, pour le nombre de neuromastes superficiels localisés sur l'orbite de l'œil, et pour l'intensité du VAB (Yoshizawa et al., 2012). Cette étude suggère donc que ces différents phénotypes sont liés, et que leur variation est due à des régions génomiques communes. Il pourrait donc y avoir une seule mutation dans un gène pléiotropique conduisant à la variation de ces phénotypes, ou bien des mutations multiples dans des gènes proches.

Une étude QTL récente sur la population Pachón a détecté 8 QTLs pour la taille de l'œil. Le QTL proche de *cryaa* est considéré comme n'étant pas sous sélection. En effet, certains QTLs sont considérés comme étant probablement sous sélection car ils sont situés à proximité de SNPs partagés par plusieurs populations CF parmi Molino, Caballo Moro, Rio Subterraneo, Pachón, Yerbaniz, Japonés, Arroyo, Curva et Chica (Bradic et al., 2013). En effet, le partage des mêmes allèles dans une région du génome par plusieurs populations indépendantes suggère que cette région est sous sélection stabilisatrice. Cependant, comme il n'est pas prouvé que toutes ces populations correspondent à des invasions indépendantes, il est possible que les SNPs partagés correspondent à un héritage d'un ancêtre commun plus récent que celui des SF et des CF actuels. Le partage de SNPs n'est donc pas forcément une signature de sélection.

4. Origine évolutive

“il est difficile de supposer que l'œil, bien qu'inutile, puisse être nuisible à des animaux vivant dans l'obscurité” (Darwin, 1859).

Tous les allèles CF pour les QTLs de la taille des yeux tendent à la diminuer (Protas et al., 2007) : cela suggère que la réduction des yeux est sous sélection. En effet, les traits qui varient sous l'effet de la dérive génétique, comme la pigmentation, ont des allèles qui augmentent ou diminuent indifféremment leur valeur.

Malgré ce résultat, certains chercheurs persistent à penser que la perte des yeux n'est due qu'à un relâchement de la pression de sélection : en effet, ce trait est très variable selon les populations cavernicoles et selon les individus (Wilkens, 2010). Cette idée que les traits régressés ont été perdus

par dérive génétique est une idée ancienne (Wilkens, 1988). L'autre hypothèse classique est celle de la perte des yeux permettant une économie d'énergie, et étant donc sélectionnée. En effet, à l'obscurité, les cellules photoréceptrices sont dépolarisées grâce à un courant entrant de Na^+ (compensé par la pompe Na/K ATPase qui provoque un courant sortant de Na^+ grâce à la consommation d'ATP), ce qui active l'ouverture de canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, et provoque l'exocytose de glutamate à la synapse. A la lumière, les canaux Na^+ se ferment (les pompes sont donc moins actives), seule la phototransduction est consommatrice d'énergie. Ainsi, les bâtonnets chez les Mammifères consomment 3 fois plus d'énergie à l'obscurité qu'à la lumière (Okawa et al., 2008), et chez le crapaud buffle, les nucléotides di-phosphates ont une concentration 10 fois plus forte à l'obscurité qu'à la lumière, suggérant une consommation accrue d'ATP (Apte et al., 1993). Cette idée de sélection directe pour la perte des yeux chez l'*Astyanax* n'est malgré tout plus tellement en vogue aujourd'hui, notamment parce que le développement des yeux nécessite de l'énergie, ainsi que probablement leur lente dégénérescence progressive. Cette perte de l'œil n'est peut-être donc pas si économe en énergie. Malgré tout, suite aux résultats des études QTL, l'hypothèse de sélection est favorisée.

Mais en quoi la perte des yeux est-elle adaptative dans les grottes ?

La perte des yeux pourrait être liée à l'acquisition d'un phénotype avantageux. Ainsi, l'amplification précoce de *Shh* chez les CF conduit à la fois à la perte des yeux mais aussi à l'augmentation du nombre de bourgeons du goût (Yamamoto et al., 2009).

Le comportement d'attraction pour les vibrations est adaptatif car il augmente la probabilité de trouver de la nourriture dans le noir (Yoshizawa et al., 2010). Or une étude QTL a montré que ce comportement était contrôlé par une région du génome qui détermine également la taille de l'œil (Yoshizawa et al., 2012). Il se pourrait donc que la mutation contrôlant la taille de l'œil ait été sélectionnée positivement seulement parce qu'elle était proche d'une mutation avantageuse permettant l'acquisition du VAB. La sélection pour la perte de l'œil aurait donc été indirecte.

Cette affirmation n'est pas acceptée par tous : en effet, les 2 régions comportant des QTLs pour la taille des yeux et le VAB sont connues pour comporter de nombreux QTL pour d'autres traits, la relation entre ces QTLs ne serait donc pas spécifique et liée à une quelconque sélection (Borowsky, 2013). De plus, les différents QTLs ne seraient pas suffisamment proches pour que l'on puisse supposer qu'il s'agisse d'une mutation unique. Enfin, le VAB repose sur les neuromastes superficiels de l'orbite de l'œil, et ne pourrait donc apparaître qu'une fois l'œil disparu.

A cela, les auteurs des publications sur le VAB répondent que seul le VAB et la taille des yeux sont connus pour être sous sélection, les autres traits dont les QTLs sont proches dans le génome ne sont pas connus pour être adaptatifs, on ne peut donc pas inférer de sélection indirecte passant par ces traits (Yoshizawa et al., 2013b). D'autre part, certains SF présentent un comportement d'attraction pour les

vibrations alors qu'ils ont des yeux, la perte des yeux n'est donc pas un préalable à l'acquisition du VAB.

Une autre théorie sur l'origine évolutive de la perte de l'œil a été proposée récemment, celle de la « décanalisation ». En effet, il existe une théorie assez ancienne selon laquelle les chaperonnes permettent à des protéines mutées de façon délétère d'acquiescer malgré tout leur conformation normale (Rutherford and Lindquist, 1998; Waddington, 1942). Cela permettrait l'accumulation de mutations silencieuses phénotypiquement : la chaperonne « canaliserait » la variabilité liée aux mutations. En revanche, si un stress survient, de nombreuses protéines vont être mal conformées et les chaperonnes ne pourront plus « tamponner » toutes ces variations. Les mutations s'exprimeront alors phénotypiquement. Il semble que Hsp90 ait eu ce rôle dans l'évolution de l'*Astyanax* CF (Rohner et al., 2013). En effet, quand des SF sont traités avec un inhibiteur de Hsp90 (le radicicol), le développement de leur œil est beaucoup plus variable que pour des SF contrôle. En revanche, quand des CF Tinaja sont traités avec le même inhibiteur, la taille de l'œil n'est pas plus variable que chez des CF contrôle, mais elle est plus petite. Il semble donc que chez les SF, des allèles ayant des effets variés sur la taille de l'œil sont « tamponnés » par Hsp90, et que chez les CF, seuls les allèles qui diminuent la taille de l'œil en l'absence de fonction Hsp90 se sont fixés. Il est à noter que la variation démasquée par l'inhibition de Hsp90 est héréditaire, et donc sélectionnable. Mais la fonction de Hsp90 est-elle réellement altérée dans les grottes ? L'eau des grottes a une plus faible conductivité que celle des rivières, ce qui représente un stress pour les poissons de surface. Et une faible conductivité a le même effet que le radicicol sur le développement de l'œil des SF. Ainsi, à l'entrée dans les grottes, les *Astyanax* auraient subi un stress dû à la faible conductivité de l'eau, et de nombreuses mutations affectant la taille de l'œil auraient été démasquées. Ces mutations auraient ainsi pu être sélectionnées assez rapidement.

Il faut noter que ce résultat concernant l'effet « canalisateur » de Hsp90 est difficilement réconciliable avec les données sur l'expression de Hsp90 au cours du développement de l'œil. En effet, aucune Hsp90 (ni α ni β) n'est exprimée dans l'œil de SF à 36hpf, juste avant l'entrée en apoptose du cristallin (Hooven et al., 2004) : il paraît donc difficile d'imaginer que Hsp90 puisse avoir un rôle canalisateur dans l'œil de SF. Il faudrait alors imaginer un rôle plus tardif, sur les mutations dans des protéines structurales de l'œil (mais auraient-elles un effet sur la taille totale de l'œil ?), ou un rôle beaucoup plus précoce, sur des mutations affectant la régionalisation de la plaque neurale et donc la taille de la rétine. Autre problème : l'inhibition de Hsp90 chez les CF diminue l'apoptose dans le cristallin (Hooven et al., 2004), et parallèlement, diminuerait la taille de l'œil (Rohner et al., 2013). Il faut donc imaginer que l'effet canalisateur de Hsp90 se produirait dans la rétine, et que l'effet délétère de Hsp90 dans le cristallin serait totalement indépendant.

Autre résultat surprenant de ce papier : comme le radicol doit être utilisé dans l'obscurité (ce produit est sensible à la lumière), les auteurs commencent par montrer que le développement de l'œil n'est pas affecté à l'obscurité. Or il a été montré précédemment que les yeux des SF, des hybrides et des CF Pachón étaient plus petits et moins pigmentés à l'obscurité qu'à la lumière (Romero and Green, 2005).

En définitive, les résultats de cet article, bien que séduisants, paraissent difficilement réconciliables avec les études antérieures, et sont donc à prendre avec beaucoup de précaution jusqu'à ce qu'ils soient confirmés ou infirmés par d'autres études.

RESULTATS



Illustration Gros plan sur la bouche et l'œil d'un *Astyanax mexicanus* SF. D'après un film de Noé Sardet pour le réseau EFOR (Etudes Fonctionnelles sur les ORganismes modèles).

A. Table de développement d'*Astyanax mexicanus*

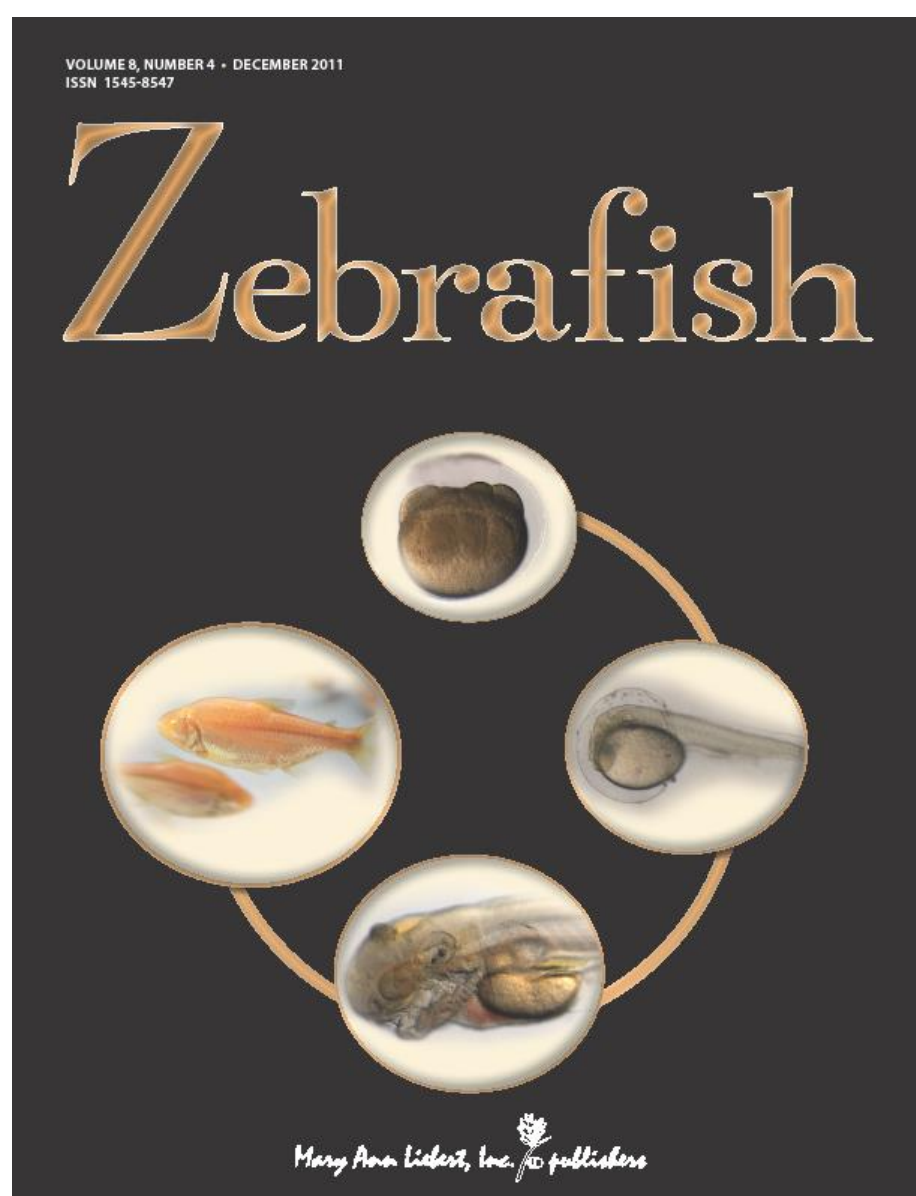
I. Introduction

Au début de ce travail, l'espèce *Astyanax mexicanus*, bien qu'étudiée pour de nombreux aspects du développement embryonnaire, ne disposait pas de table de développement. Celle-ci est pourtant d'autant plus nécessaire qu'il faut s'assurer que les embryons des deux populations (SF et CF) se développent de manière synchrone avant de pouvoir s'intéresser à des différences éventuelles sur des phénotypes particuliers, comme des patrons d'expression.

De manière plus générale, la disponibilité d'une table de développement rend une espèce modèle plus « visible » pour les autres communautés de chercheurs, et permet de comparer plus facilement les résultats obtenus dans cette espèce avec ceux d'autres espèces. Et ici, si les futures études sur l'*Astyanax* se réfèrent à cette table, cela devrait rendre les résultats des différentes équipes plus comparables (certaines ayant jusqu'ici élevé les embryons à 22, à 23 ou à 26°C).

Je me suis intéressée à la comparaison des morphologies des embryons SF et CF au cours du clivage, de la gastrulation, de la neurulation et de la somitogenèse, pour un développement à température constante de 23°C. J'ai comparé ce « timing » de développement entre les deux types d'embryons, et à celui du poisson-zèbre (Kimmel et al., 1995; Parichy et al., 2009). Je me suis également intéressée à certains caractères particuliers comme la taille du vitellus, la taille de l'œil, le nombre de rayons des nageoires, la vessie natatoire et la position de la nageoire dorsale, au cours du développement larvaire. En plus des données sur les SF et les CF Pachón, certaines analyses ont également été menées sur des hybrides F1 de ces deux morphes.

II. Article publié dans *Zebrafish*



A Developmental Staging Table for *Astyanax mexicanus* Surface Fish and Pachón Cavefish

Hélène Hinaux,¹ Karen Pottin,¹ Houssein Chalhoub,¹ Stéphane Père,¹ Yannick Elipot,¹
Laurent Legendre,² and Sylvie Rétaux¹

Abstract

Every model species requires its own developmental table. *Astyanax mexicanus*, a teleost fish comprising both sighted river and blind cave populations, is becoming more and more important in the field of developmental and evolutionary biology. As such, a developmental staging table is increasingly necessary, particularly since comparative analysis of early developmental events is widely employed by researchers. We collected freshly spawned embryos from surface fish and Pachón cavefish populations. Embryos were imaged every 10–12 min during the first day of development, and less frequently in the following days. The results provide an illustrated comparison of selected developmental stages from one cell to hatching of these two populations. The two morphs show an essentially synchronous development regarding major events such as epiboly, neurulation, somitogenesis, heart beating, or hatching. We also present data on particular morphological characters appearing during larval development, such as eye size, yolk regression, swim bladder, and fin development. Some details about the development of F1 Pachón cave × surface hybrids are also given. Comparisons are made with *Danio rerio* (zebrafish) development.

Introduction

THE STUDY OF ANY MODEL ORGANISM is greatly enriched by the availability of a developmental staging table.^{1–3} This is particularly true for developmental and evolutionary biology studies, as it allows an accurate comparison of different species or populations.

Astyanax mexicanus, also previously called *Astyanax fasciatus*, is a teleost fish, belonging to the Ostariophysi group, the same group as the zebrafish *Danio rerio*. However, *Astyanax* is a characiform while *Danio* is a cypriniform, these two lineages having diverged between 100 and 250 million years ago^{4,5} (Fig. 1). First described by de Filippi,⁶ *Astyanax mexicanus* is widely distributed and endemic to the rivers of Central and South America. Several populations of cave morphs have a very restricted distribution to 29 caves in the region of the Sierra de El Abra in Mexico.⁷

Astyanax is increasingly employed as an evo-devo model system.^{8,9} Indeed, two types of populations, namely sighted and pigmented river-dwelling populations and blind and unpigmented cave populations, all deriving from surface fish ancestors, are powerful tools for evolutionary biology. The cave forms have diverged at least one million years ago from eyed ancestors, and have evolved specific morphological, neurological, and behavioral traits, allowing their adaptation

to the cave environment, characterized by permanent darkness and food scarcity.¹⁰ Surface and cave forms are still inter-fertile and their cross produces a fertile progeny. A comparative study of the surface and cave forms reveals mechanisms of micro-evolution. Furthermore, at least three independent colonization events are at the origin of the 29 known cave populations,^{11,12} permitting the study of parallel evolution.¹³

Pachón has been the most commonly used cave population, particularly in evo-devo studies. The transparency of *Astyanax mexicanus* embryos, as well as the fact that abundant spawning can be obtained regularly, facilitates these developmental studies. The synchronous development of Pachón and surface embryos has been hypothesized,^{14–20} but never precisely assessed, and no developmental staging table exists for this species. The purpose of this study is to describe and analyze certain developmental details of surface and Pachón fish embryos from the one-cell stage to hatching, and to gain some insights into larval development in these two populations as well as in F1 hybrids.

Materials and Methods

Laboratory stocks of *A. mexicanus* surface fish and Pachón cave fish were obtained in 2004 from the Jeffery laboratory at

¹UPR 3294 N&D Laboratory, DECA Group, and ²GIS AMAGEN CNRS INRA, Institut Alfred Fessard, Gif-sur-Yvette, France.

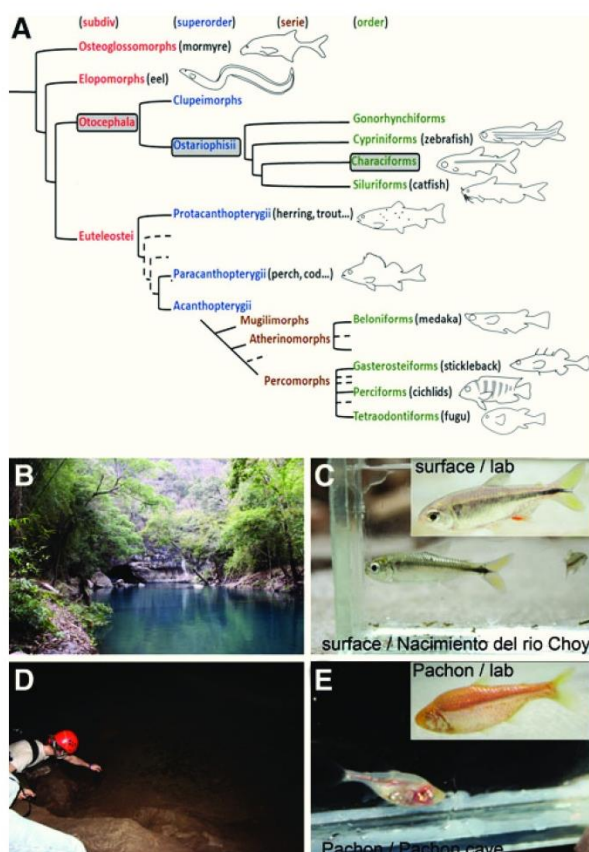


FIG. 1. Presentation of *Astyanax mexicanus* model fish. (A) Simplified phylogeny of the teleosts, showing *Astyanax mexicanus* positioned among the Characiforms. (B) Example of the habitat of the surface form of *Astyanax mexicanus*, in Nacimiento del Rio Choy. (C) *Astyanax mexicanus* surface morphs, caught in the wild and a lab specimen (inset). (D) Pachón cave habitat. (E) *Astyanax mexicanus* Pachón cave morphs, caught in Pachón cave and a lab specimen (inset).

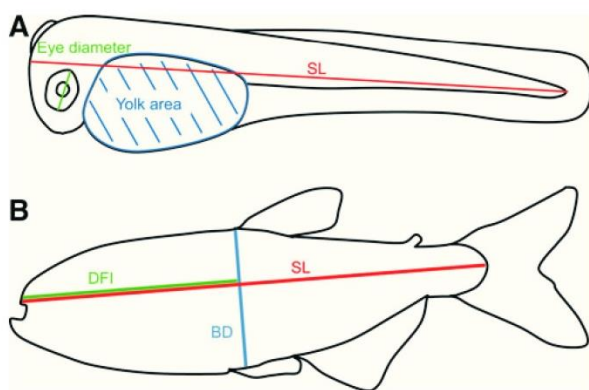


FIG. 2. Methods for fish measurements. (A) Measurements performed on larvae. (B) Measurements performed on adults. BD, body depth; DFI, dorsal fin insertion; SL, standard length.

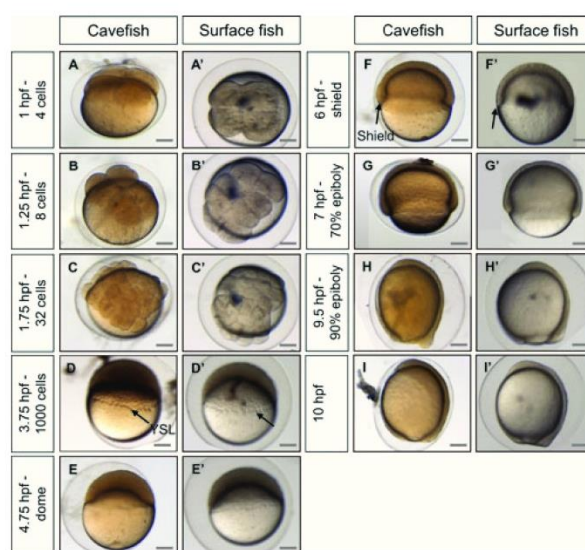


FIG. 3. Development of *Astyanax mexicanus* embryos from zero to 10 hpf. Pictures of cavefish (A–I) and surface fish (A'–I') embryos at stages indicated on the left, views are lateral, except for A–C' (views from the animal pole). Arrows indicate the yolk syncytial layer (YSL) in D–D' and the embryonic shield in F–F'. The scale bars represent 200 μm .

the University of Maryland, College Park, MD. They had been both lab-raised for some generations, and surface fish had initially been collected in San Solomon Spring, Balmorhea State Park, Texas.

In our facility, they were maintained and bred at 23°C (Pachón) and 26°C (surface) on a 12:12 hours light/dark cycle in tap water (pH 8.1–8.2, conductivity 470–590 $\mu\text{S}/\text{cm}$). These conditions are not too different from the natural environment of these fish (water in Pachón cave: 23.3°C, pH 6.9; water in Nacimiento del Rio Choy: 26°C, pH 7, conductivity 1200 $\mu\text{S}/\text{cm}$; measurements done in March 2009 and March 2011). Surface \times Pachón F1 hybrids were obtained by cohabitation of a female Pachón fish and a male surface fish.

Fish are fed twice a day, once with live food (mosquito worms, artemias) and once with dry food. Surface fish receive TetraMin floating flakes (complete food for all ornamental fish, Tetra) as they feed at the water surface, and cave fish receive TetraPrima Discus sinking granules (complete food for Discus and big ornamental fish, Tetra) as they are bottom feeders. Spawning is induced by changing tank water and shifting temperature (-4°C for surface fish, $+4^{\circ}\text{C}$ for cavefish). It usually occurs in the middle of the night (between midnight and 2:00 AM). Embryos and larvae are maintained in a 23°C incubator in “blue water” (0.017 M NaCl, $4.02 \cdot 10^{-4}$ M KCl, $2.72 \cdot 10^{-4}$ M CaCl_2 , $6.5 \cdot 10^{-4}$ M MgSO_4 , methylene blue) for 3–4 weeks, and then transferred to “nurseries” in the main fish facility.

For the establishment of the developmental staging table, freshly spawned embryos were collected and imaged every 10–15 min using an Olympus SZX16 stereomicroscope in a room maintained at 23°C. To facilitate somite counts, the chorion of some embryos was removed. Newly hatched larvae were photographed once or twice a day. Pictures of some details of

the larvae were taken using an Apotome microscope (Zeiss). Adult fish were photographed using a Pentax X70 camera.

Standard length (length from snout to caudal fin peduncle), yolk size, eye size, and dorsal fin placement (projection of snout to dorsal fin-length divided by standard length) were measured using ImageJ software. Details of anatomical measurements performed on larvae and adults are depicted in Figure 2. Lengths of the embryos for yolk regression analysis were calculated by extrapolating embryos to a circle, calculating the circumference of this circle and subtracting the head-to-tail straight line length.

Paper chromatography was performed using Whatman paper as the stationary phase and a hexane:benzene 40:60 solution as the solvent. Fresh samples were squeezed against the paper. Spinach leaves were used as reference for pigment separation.

Results and Discussion

Embryonic development

The development of surface and Pachón embryos was monitored every 10–15 min at 23°C. *Astyanax* embryos are surrounded by a soft chorion like that in *Danio*. However, the *Astyanax* chorion is sticky, leading to the formation of egg clusters, as in Medaka. Segmentation proceeds approximately at the same pace as in *Danio rerio*, with one division every 15 min from the 2-cell stage (Fig. 3). The 1000-cell stage, characterized by the appearance of the yolk syncytial layer (YSL), is reached at 3.75 hpf. Gastrulation proceeds through epiboly and the embryonic shield is visible at 6 hpf, which corresponds to 50% epiboly. Epiboly is completed around

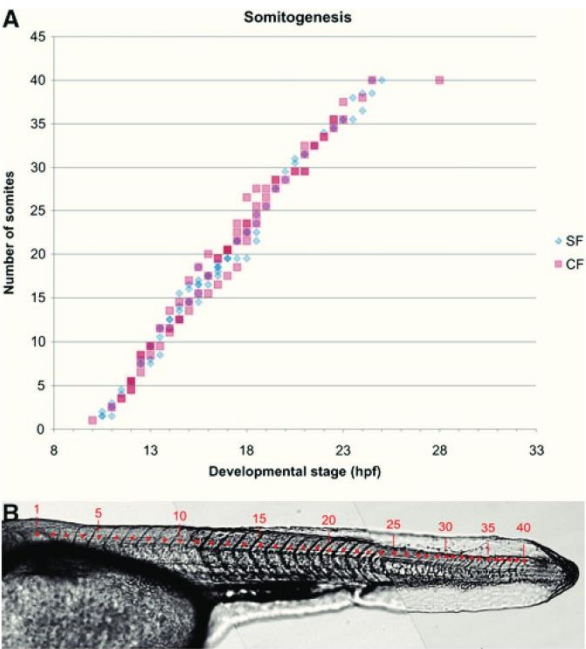


FIG. 5. Somitogenesis. (A) Timing of somitogenesis in surface and cave embryos as a function of developmental stage. (B) Picture showing the definitive number of somites in a 30 hpf surface larva. Each red dot indicates one somite. SF means surface fish (blue), and CF means cave fish (red), as in all following figures.

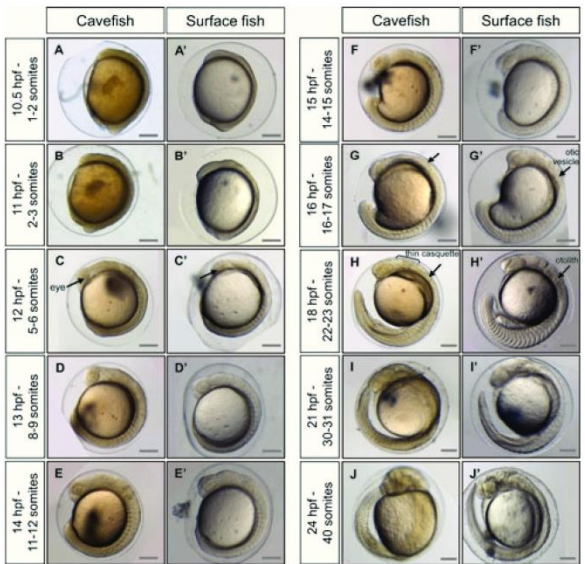


FIG. 4. Development of *Astyanax mexicanus* embryos from 10 hpf to 24 hpf. Pictures of cavefish (A–J) and surface fish (A'–J') embryos in lateral views, at stages indicated on the left side. Arrows in C–C' indicate the eye, in G–G' the otic vesicle, in H–H' an otolith. The bracket in H indicates the forming casquette, an adhesive gland on the head of the larvae. The scale bars represent 200 μ m.

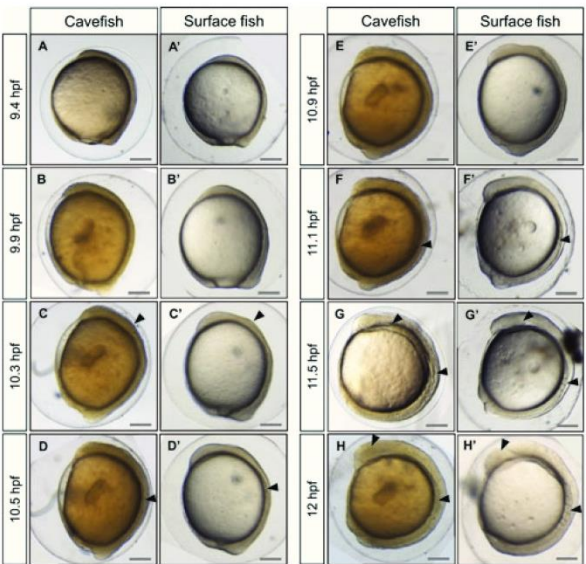


FIG. 6. Morphogenetic events during neurulation. Pictures of cavefish (A–H) and surface fish (A'–H') embryos in lateral views, with exact stages indicated on the left. Arrowheads in C–C' and D–D' point to comparable shapes and curvatures of the anterior neural plate. Arrowheads in F–F' indicate the first appearing somites. In G–G' and H–H' arrowheads indicate the somites and the forming eye. The scale bars represent 200 μ m.

TABLE 1. MAIN DEVELOPMENTAL LANDMARKS IN *ASTYANAX MEXICANUS* DEVELOPMENT, COMPARED TO *DANIO RERIO*

<i>Astyanax</i> (23°C)	Developmental Landmarks	<i>Zebrafish</i> (28.5°C)
0 hpf	1-cell stage	0 hpf
0.75 hpf	2-cell stage	0.75 hpf
1 hpf	4-cell stage	1 hpf
1.25 hpf	8-cell stage	1.25 hpf
1.5 hpf	16-cell stage	1.5 hpf
1.75 hpf	32-cell stage	1.75 hpf
2 hpf	64-cell stage	2 hpf
3.75 hpg	1000-cell stage (YSL)	3 hpf
6 hpf	Shield formation	6 hpf
10.5 hpf	Beginning of somitogenesis	10.33 hpf
12 hpf	Eye formation	12 hpf
14 hpf	Otic vesicle becomes visible	19 hpf
15.5 hpf	Otic vesicle with central depression	
16 hpf	Early motility (first muscle contraction)	36 hpf
18 hpf	Otolith development	22 hpf
18 hpf	Very thin casquette becomes visible	
18.5 hpf	Lens becomes visible	19 hpf
21 hpf	Heart beat; early pigmentation	24 hpf
24 hpf	End of somitogenesis	25 hpf
24.5–28 hpf	Hatching	48 hpf
1.5 dpf–2.7 mm SL	Pectoral fin bud	42 hpf
3.5 dpf–4 mm SL	Jaws formation	60 hpf–3.4 mm SL
4.5 dpf–4 mm SL	Casquette disappearance	3.5 mm SL
	Formation of swim bladder	
4–5 mm SL	Yolk complete regression	6.5 mm SL
5–6 mm SL	Caudal fin ray appearance	4.9 mm SL
5.5 dpf–3.9 mm SL	Inflated swim bladder	3.7 mm SL
6–7 mm SL	Anal fin ray appearance	6.3 mm SL
8.5 mm SL	Adipose fin bud appearance	
8.5 mm SL	Pelvic fin bud appearance	7.5 mm SL

10.5 hpf, a time which also corresponds to the appearance of the first somite (Fig. 4). Somitogenesis proceeds synchronously in the two populations (Figs. 4 and 5), with one pair of somites added every 20 min. Neurulation begins between 9.6 and 9.9 hpf, with a visible thickening of the anterior neural plate (Fig. 6). All subsequent developmental milestones are also synchronous in the two populations (Table 1). The eye starts developing at 12 hpf, when 5–6 somites are visible. The otic vesicle becomes visible around 13–14 hpf (8–12 ss), and a central depression is dug at 16–17 hpf (16–12 ss). Around the same time, the embryo starts moving with uncontrolled contractions in the chorion. The tail starts detaching from the yolk and is completely free from any yolk streak around 23 hpf. The casquette, a transient adhesive gland located on

the head of the young larvae,¹⁷ becomes visible as a very thin ectodermal thickening at 18 hpf. The lens is visible half an hour later. The heart starts beating around 21 hpf. The larvae hatch between 24.5 and 28 hpf (Fig. 4, Table 1).

Astyanax embryonic development at 23°C therefore strongly resembles that of *Danio rerio* at 28.5°C,² but is significantly quicker from 12 hpf onwards. Its development is even faster at 28°C. Indeed, at 28°C embryos progress from shield to bud stage in 2.5 h, which normally takes 4 h at 23°C (data not shown). However, at this temperature the survival rate is low, and as such, 23°C appears to be the ideal temperature at which to maintain embryos. Surface and Pachón cavefish embryos have a completely synchronous development until hatching. The early development of Pachón × surface hybrid embryos is synchronous as well (Supplementary Fig. S1; Supplementary data are available online at www.liebertonline.com/zeb). The only difference between the two types of embryos is with respect to pigmentation: Pachón embryos remain unpigmented, whereas the eye and yolk of surface fish embryos start showing pigment cells (black melanophores) between 19 and 23 hpf (Fig. 4, Table 1).

Another intriguing variation between these embryos is the color of the yolk from spawning time: surface embryos are completely transparent, whereas Pachón embryos are slightly orange while remaining translucent (Fig. 3). We hypothesized that this difference could stem from feeding differences in breeding adults in our facility (see Methods). We performed paper chromatography of cave and surface food jointly with spinach extracts used as a reference (Supplementary Fig. S2). This analysis showed that adult cavefish food contains carotenes while surface fish food does not. Thus, the orange coloration of the cavefish yolk could be the result of carotene reserves. Paper chromatography of cave and surface egg extracts showed that cave eggs contain xanthophylls, raising the possibility that cave females oxygenate carotenes from their food and incorporate the resulting xanthophylls into their eggs (Supplementary Fig. S2). This would explain why hybrid embryos also appear yellowish (Supplementary Fig. S1), as the mother of these hybrids is a Pachón cavefish.

Larval development

After hatching, *Astyanax* larvae are first twisted but then straighten within half an hour. They possess 40 somites, the definitive number being reached at 25 hpf (Figs. 5 and 7Bb). Zebrafish on the other hand reach 30–32 somites at 25 hpf and hatch at 48 hpf.^{2,21} Most *Astyanax* sensory organs are functional upon hatching: the otic vesicle is well developed with 2 otoliths (appeared at 18 hpf (Fig. 4)), the casquette is smooth and sticky (Fig. 7Aa), the lateral line primordium can be seen along the larva body (Fig. 7Ab), nostrils are open (Fig. 7Ba), the lens and retina are clearly recognizable (Fig. 7Bd), with the ventral quadrants missing or reduced in cave larvae (Fig. 7Ac).¹⁶ Certain other structures can be documented: the cloaca is formed (Fig. 7Ae) but the rest of the digestive tract cannot be recognized. A pectoral fin bud can be seen along the yolk (Fig. 7Ad). Cells of the notochord are round and do not overlap (Fig. 7Bc). Skin differentiation is nearly complete: keratinocytes aggregate in the caudal fin (Fig. 7Af) and mucus cells can be seen in the epidermis (Figs. 7Be and 7Bf).

Half a day later at 2 dpf (Figs. 7C and 7D), larvae have grown (2.7 to 3.5 mm standard length), as has the pectoral fin

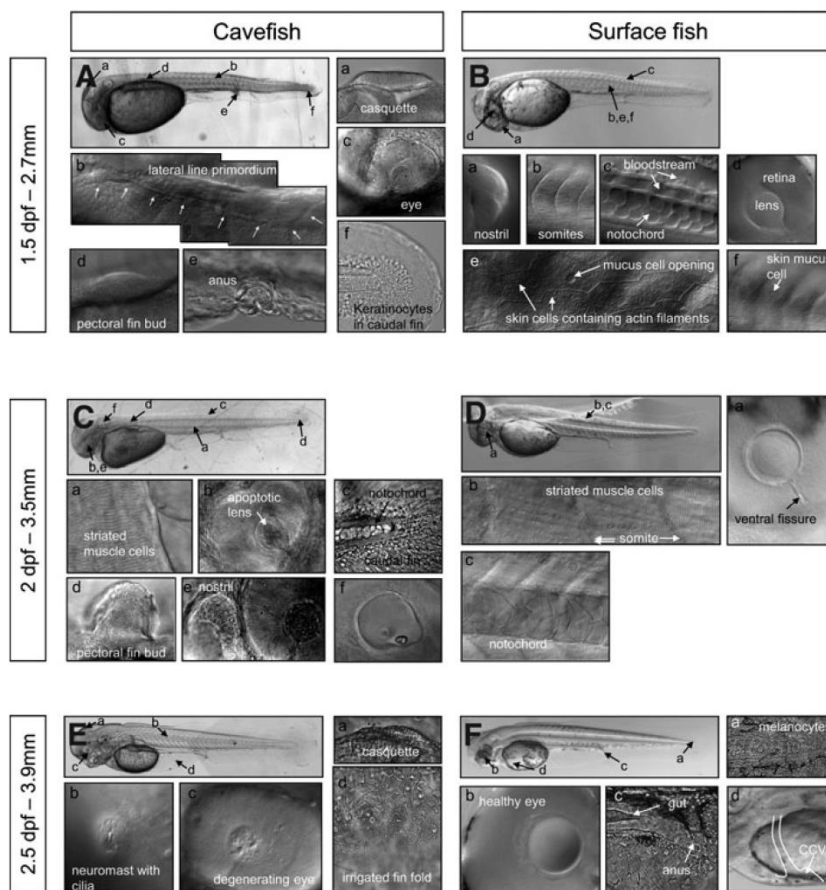


FIG. 7. Early larval development. Cavefish (A, C, E) and surface fish (B, D, F) embryos in lateral views, at 1.5 dpf (A, B), 2 dpf (C, D), and 2.5 dpf (E, F). In all images, anterior is left and dorsal is up. Images of anatomical details are shown and located on the global view, and captions are written in full on the pictures. CCV stands for common cardinal vein, also called duct of Cuvier.

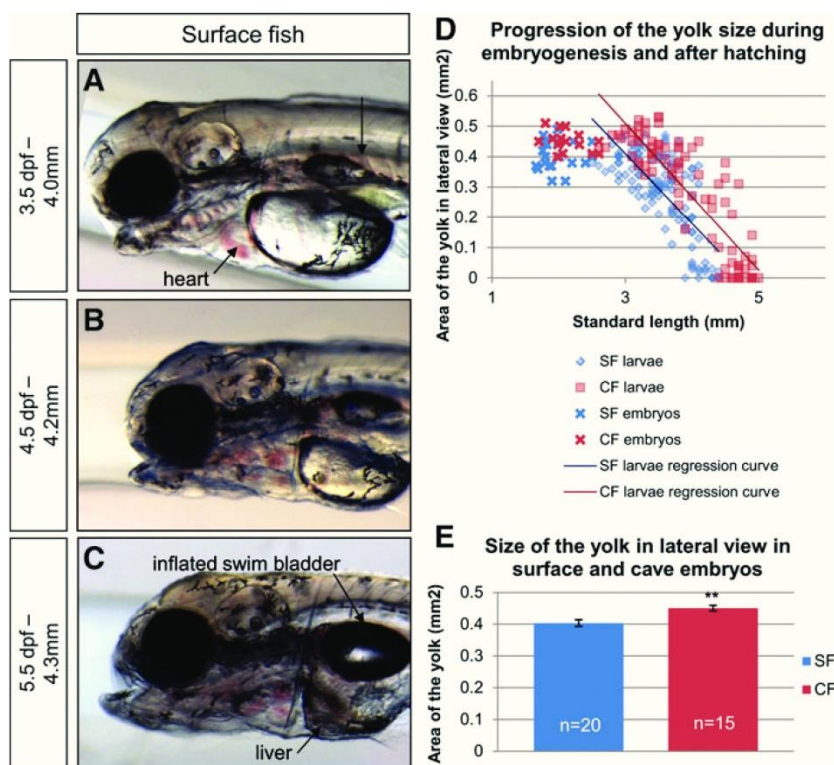


FIG. 8. Yolk regression during the first days of larval life. (A–C) Surface fish larvae in lateral view at 3.5 dpf, 4.5 dpf, and 5.5 dpf. The black arrow in A indicates the forming swim bladder. (D) Quantification of the yolk size and its progressive disappearance, as seen in lateral view, in surface (blue symbols) and cave (red symbols) embryos and larvae. (E) Mean size of the yolk in surface and cave embryos from 10 to 20 hpf. Statistical significance was calculated using Mann-Whitney test.

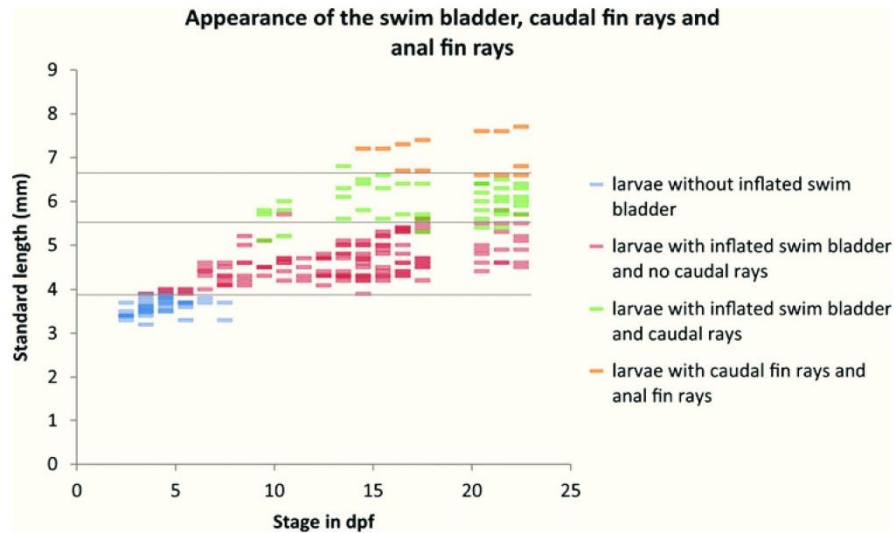


FIG. 9. Standard length-dependence of certain larval characteristics. Surface fish larvae reared at 23°C or 28°C and at different population densities (from 5 to 150 per 60 mm dish) were assessed for the appearance of certain larval characteristics and reported as a function of age (*x-axis*) and SL (*y-axis*) during 3 weeks. Colors indicate swim bladder inflation (*red*), appearance of caudal (*green*), and anal (*orange*) fin rays, as indicated on the *right*.

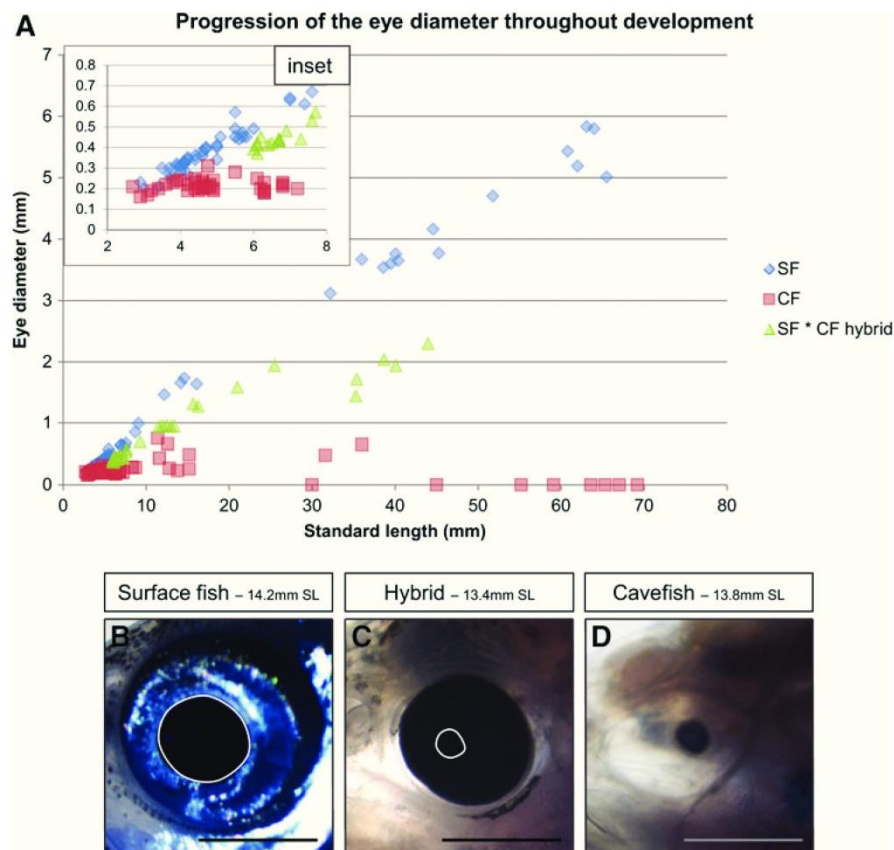


FIG. 10. Eye size during development. (A) Quantification of eye diameter in surface (*blue*), cave (*red*), and F1 hybrid (*green*) larvae, as a function of standard length. The *inset* shows a magnification of the measures for early embryos. (B–D) Pictures of the eye of equally sized surface (B), hybrid (C), and cave (D) fishes. *Solid lines* outline the lens. In cavefish, the degenerated eye appears slightly dark because it is a cyst of high density, which makes it difficult for the transmitted light to cross. The scale bar represents 1 mm.

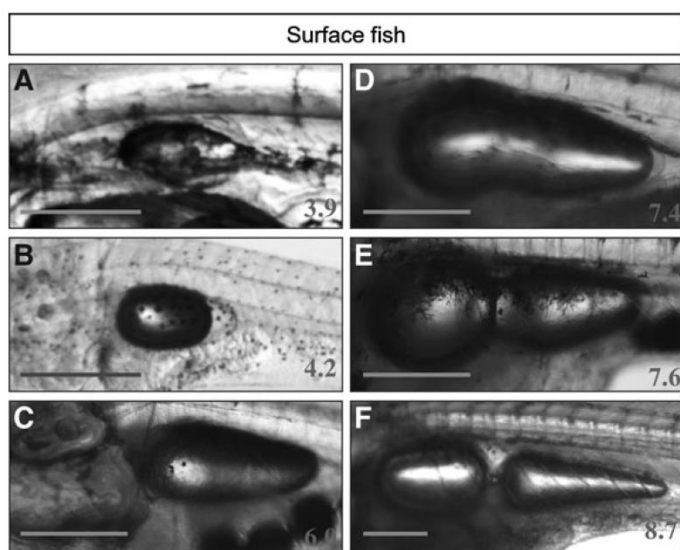


FIG. 11. Swim bladder development. (A–F) Pictures of surface fish larvae in lateral views, with the anterior side on the left. Their standard lengths (SL) are indicated on the bottom right corner of the pictures. The scale bar represents 500 μ m.

bud (Fig. 7Cd). The cells of the notochord are bigger, overlapping, and polygonal in shape (Figs. 7Cc and 7Dc). Striated muscle cells are clearly visible (Figs. 7Ca and 7Db). Blood appears clearly red in vessels (not shown but see Fig. 8). The apoptotic lens of the cave larvae appears rippled (Figs. 7Cb and 7Ce), in contrast with the smooth and healthy lens of surface larvae (Fig. 7Da).

At 2.5 dpf (Figs. 7E and 7F), larvae begin to develop jaws. Neuromasts with their cilia can be observed along the lateral line (Fig. 7Eb). The casquette is usually bumpier than at 1.5 dpf (Fig. 7Ea). In the cavefish degenerating eye, the lens is barely recognizable (Figs. 7Ec and 7Fb). The digestive tract is almost complete (Fig. 7Fc). In surface fish, star-shaped melanocytes can be seen in the skin (Fig. 7Fa). The vitelline blood circulation of the larvae strikingly resembles that of zebrafish but not medaka,^{22,23} with a single common cardinal vein on the yolk (Fig. 7Fd, Supplementary Video SV1; Supplementary Video is available on www.liebertpub.com/zeb).

At 3.5 dpf, the casquette is completely degenerated (Fig. 8A). The swim bladder becomes visible as a deflated pouch (Fig. 8A). It will inflate only at 5.5 dpf, when the digestive tract is complete and larvae start feeding. At this time the yolk, which has progressively reduced since hatching, has mostly disappeared (Figs. 8A–8C). Yolk regression proceeds linearly from hatching, until complete disappearance when larvae reach 4.5–5 mm standard length (Fig. 8D). Cave embryos possess a slightly larger yolk and use it at the same rate as surface larvae, so that yolk disappears later in cave larvae (Figs. 8D and 8E). This confirms previous reports of bigger eggs in subterranean *Astyanax*.^{24,25}

The larger the larvae become, the more their growth and development depends on the space they occupy and the density of the population in which they are reared. For instance, a 2-month-old larva can measure from 6 to 20 mm, depending on the water volume, the population density, the temperature, and the amount of food available. The definitive adult size (6–7 cm) is reached within 1 to 3 years. Most characteristics depend on the standard length (SL) of larvae rather than their age. For example, the swim bladder inflation can

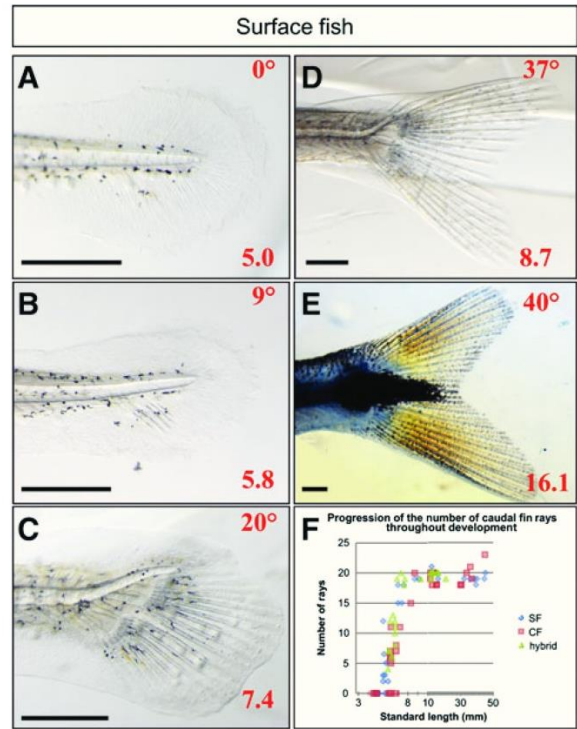
occur between 3.5 and 7.5 dpf, but is always achieved at 3.9 mm SL (Fig. 9, red dots). The appearance of caudal fin rays and anal fin rays also depends on standard length (Fig. 9, green and orange dots, respectively). Thus, the relevant measure to stage the larvae is the standard length, and not the age, as in zebrafish.²⁶ In all of the following figures, observed characteristics will therefore be analyzed as a function of the standard length.

Eye development

One major difference between surface and cave adult fish is the presence or absence of an eye. The degeneration of the cavefish eye was monitored throughout larval development to adulthood, by measuring the diameter of the eyes of surface, Pachón cave and F1 hybrid larvae, and young adults (Figs. 2 and 10A). Cavefish eyes undergo almost normal morphogenesis (see also Fig. 4) and grow during the first days of larval development, but the eye diameter never exceeds 0.3 mm (Fig. 10A inset), and eventually decreases to zero. In contrast, surface fish eyes undergo continuous growth until adulthood. F1 hybrid eyes also grow until adulthood, but at all stages they are smaller than surface fish eyes, as previously shown.²⁷ For illustration, pictures of surface, cave, and hybrid eyes of approximately 14 mm SL larvae are shown (Figs. 10B–10D).

Swim bladder development

The swim bladder develops the same way in surface, cave, and hybrid larvae. At approximately 4 mm SL it inflates, and then grows antero-posteriorly (Figs. 9 and 11). A bud appears anteriorly when the larvae reach about 7 mm SL and gives rise to the anterior swim bladder. Around 8.5 mm SL, anterior and posterior swim bladders are connected only by a thin tube, as in adults. This is the same type of development as seen in *Danio rerio*, even if corresponding standard lengths differ,²⁶ as adult zebrafish are much smaller than *Astyanax mexicanus*.



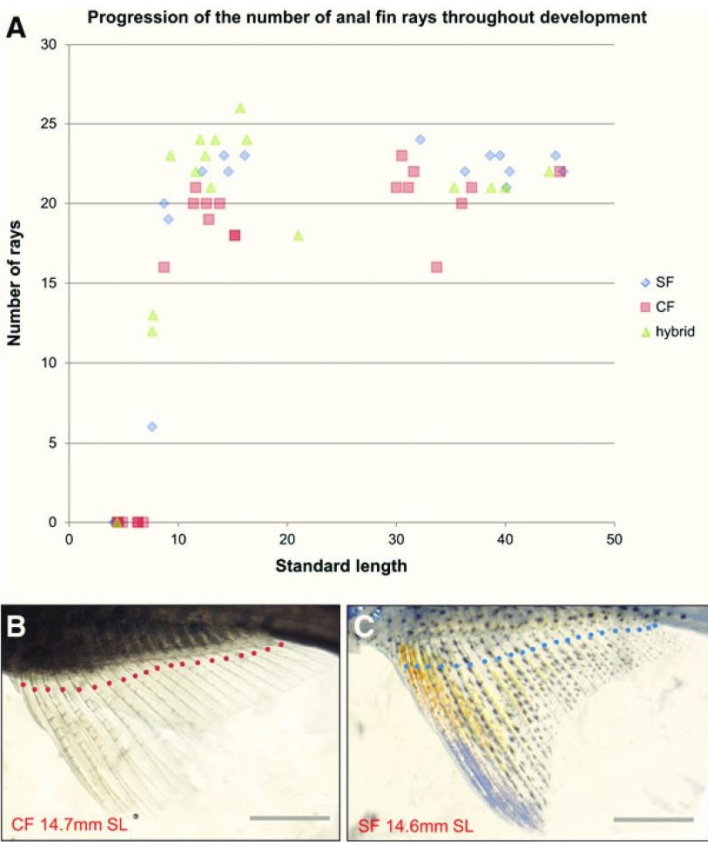
Fin development

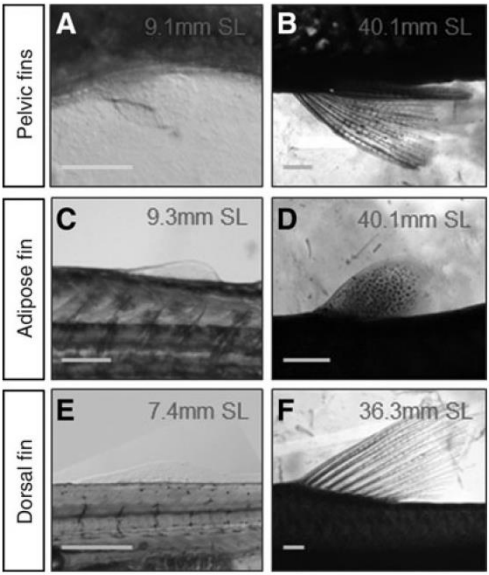
The caudal fin is the first to develop, with the first rays appearing around 5 mm SL (Fig. 12). The notochord progressively bends dorsally so that the spine is found finally only in the dorsal part of the fin. The definitive number of rays (20 rays, with some inter-individual variation observed) is reached at 9 mm SL in all populations (Fig. 12G). Hybrid and surface larvae develop the same way, with pigmentation appearing progressively: first, a central black melanophore spot together with melanophores between the rays; and then, xanthophores appear on the entire fin (Figs. 12A–12F). In contrast, cave fish are never pigmented but development of the fin structure as a function of length follows the same time course as surface and hybrid larvae.

The anal fin appears at 7 mm SL. Cave fish were reported to possess fewer anal fin rays as adults than surface fish,²⁸ which

FIG. 12. Caudal fin development. (A–E) Surface fish larvae caudal fins in lateral views, with standard lengths indicated at the *bottom right* of each picture. The bending angle of the notochord is indicated in the *top right corner* of each picture. The scale bars represent 500 μ m. (F) Quantification of the number of caudal fin rays as a function of standard length in surface (blue), hybrid (green), and cavefish (red).

FIG. 13. Anal fin development. (A) Quantification of the number of anal fin rays as a function of standard length in surface, hybrid, and cavefish. (B) Cavefish anal fin, with red dots indicating the rays. (C) Surface fish anal fin, with blue dots indicating rays. The scale bars represent 1 mm.





is why we analyzed anal fin ray number throughout development. The definitive number of anal fin rays is reached at 15 mm SL approximately (around 23 rays), and is indeed slightly lower in cave fish (around 20 rays) (Fig. 13). Similarly F1 hybrids tend to have only 20 rays.

The pelvic fin buds appear at 9 mm SL, and rays are formed at 11.5 mm SL (Figs. 14A and 14B). The adipose fin, a fleshy fin located posteriorly to the dorsal fin, also appears as a bud at 9 mm SL and remains without rays (Figs. 14C and 14D). This special type of fin can be found in characids but also in lizardfishes (Synodontidae), Siluriforms, and salmonids (Salmonidae).^{29,30} Finally, the dorsal fin, consisting of 10 or 11 rays, first appears at 8 mm SL and all rays are present around 10mm SL (Figs. 14E and 14F).

FIG. 14. Pelvic, adipose, and dorsal fin development. Pictures of pelvic fins (A, B), adipose fins (C, D), and dorsal fins (E, F) in surface fish of various standard lengths. The scale bars represent 250 μ m in A, C, E, and 1 mm in B, D, F.

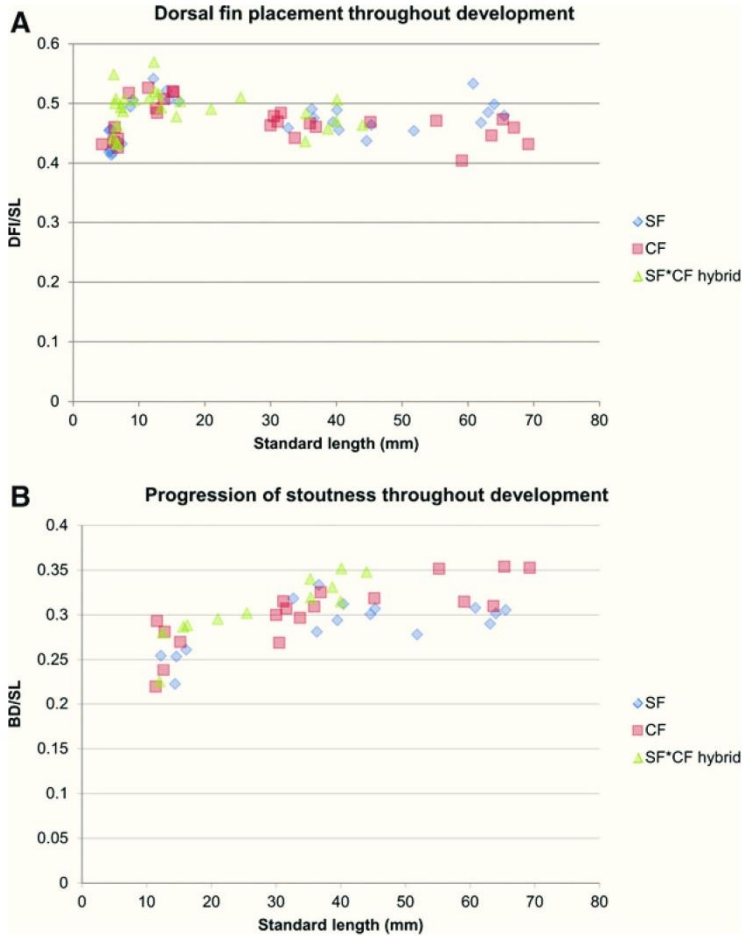


FIG. 15. Global body shape. (A) Quantification of the placement of the dorsal fin along the body axis (see Fig. 2 for Methods) as a function of the standard length. (B) Quantification of body stoutness as a function of the standard length. For adult specimens (above 40 mm SL), the values are always higher for cavefish.

Development of global body shape

The dorsal fin has previously been reported to be positioned more posteriorly in Pachón fish than in surface fish.²⁸ We measured its placement throughout development but were unable to confirm this observation: our data, obtained with projection on the body axis to correct for differences in corpulence between the two populations (Fig. 2) show identical dorsal fin placement in surface, Pachón cave, and F1 hybrid fishes (Fig. 15A). We also quantified stoutness (body depth divided by SL, Fig. 2). As expected from general observations and from the fact that Pachón fish are fatter than surface fish (at least in laboratory conditions), for individuals with SL above 40 mm, Pachón fish were more corpulent than surface fish (Fig. 15B). Thus, the QTL reported by Protas et al. (2008) may be related to a difference in growth and global body shape, rather than to a difference in dorsal fin placement in cavefish.

Conclusion

Astyanax mexicanus embryonic development is very fast: a swimming larva hatches one day after fertilization at 23°C. Embryos and early larvae are totally transparent, allowing for live imaging as well as high quality molecular histology. Surface fish and Pachón cavefish embryos and larvae exhibit a strictly synchronous development, allowing rigorous comparisons between these two populations both during embryogenesis and in later development. In the laboratory, embryos and larvae of each population are nevertheless easily recognizable by the color and shape of early embryos, the presence or absence of pigmentation, and the morphology of the eye. Some very slight variations between individuals can sometimes be observed, mostly in cavefish. During development, somitogenesis proceeds with some interindividual variation (Fig. 5), and cavefish embryos are globally more variable than surface fish embryos. This is also true for the eye development (Fig. 10) and for all molecular markers studied so far. On the other hand, adults within a single population differ only in gender-dependent body shape (females have a rounder belly than males), and, for surface fish, by pigmentation influenced by the social status (dominant individuals have more intense orange spots on the anal fin). Together with the facts that 1) *Astyanax* is easy to propagate and regularly provides a large number of embryos, 2) surface and cave fishes can breed and allow genetic approaches, and 3) the evolutionary history of the different populations is known, the developmental features we have described here contribute to the making of *Astyanax mexicanus* an excellent model for evolutionary developmental biology, as well as for developmental biology *per se*. The current limitations of the model for transcriptomics, genomics, and transgenesis should also be overcome in the very near future.

Acknowledgments

Work supported by an ANR grant (ASTYCO) to SR. Thanks to Philippe Herbolme with whom we “traveled” through *Astyanax* larvae under Nomarski optics at the early stages of the project. We also wish to thank Matthieu Simion and the animal facility staff for help and advice in fish care, and Heather McLean for improvement of our English.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Iwamatsu T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech Develop* 2004;121:605–618.
2. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995;203:253–310.
3. Swarup H. Stages in the development of the stickleback *Gasterosteus aculeatus* (L.). *J Embryol Exp Morph* 1958;6:373–383.
4. Briggs JC. The biogeography of otophysan fishes (*Ostariophysi:Otophysi*): A new appraisal. *J Biogeogr* 2005;32:287–294.
5. Peng Z, He S, Wang J, Wang W, Diogo R. Mitochondrial molecular clocks and the origin of the major Otocephalan clades (Pisces: Teleostei): A new insight. *Gene* 2006;370:113–124.
6. De Filippi F. Nouvelles espèces de poissons. *Revue Magasin Zoologie*. 1853; (Serie 2) volume 5: 164–171.
7. Mitchell RW, Russell WH, Elliott WR. Mexican eyeless characin fishes, genus *Astyanax*: Environment, distribution, and evolution. *Spec Publ Mus Texas Tech Univ* 1977;12:1–89.
8. Jeffery WR. Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Dev Biol* 2001;231:1–12.
9. Jeffery WR. Emerging model systems in evo-devo: Cavefish and microevolution of development. *Evol Dev* 2008;10:265–272.
10. Wilkens H. Evolution and genetics of epigeal and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the neutral mutation theory. In: Hecht, MK, Wallace, B (Eds) *Evolutionary Biology* vol 23 Plenum, New York and London. 1988:271–367.
11. Strecker U, Bernatchez L, Wilkens H. Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Mol Ecol* 2003;12:699–710.
12. Strecker U, Faundez VH, Wilkens H. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Mol Phylogen Evol* 2004;33:469–481.
13. Jeffery W. Regressive evolution in *Astyanax* cavefish. *Ann Rev Gen* 2009 43:25–47.
14. Alunni A, Menuet A, Candal E, Penigault JB, Jeffery WR, Retaux S. Developmental mechanisms for retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *J Comp Neurol* 2007;505:221–233.
15. Menuet A, Alunni A, Joly JS, Jeffery WR, Retaux S: Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: Multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development* 2007;134:845–855.
16. Pottin K, Hinaux H, Retaux S: Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* 2011;138:2467–2476.
17. Pottin K, Hyacinthe C, Retaux S. Conservation, development, and function of a cement gland-like structure in the fish *Astyanax mexicanus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:17256–17261.
18. Yamamoto Y, Byerly MS, Jackman WR, Jeffery WR. Pleiotropic functions of embryonic sonic hedgehog expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Dev Biol* 2009;330:200–211.
19. Yamamoto Y, Jeffery WR. Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science* 2000;289:631–633.

20. Yamamoto Y, Stock DW, Jeffery WR. Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* 2004;431: 844–847.
21. Holley SA. The genetics and embryology of zebrafish metamorphosis. *Dev Dyn* 2007;236:1422–1449.
22. Fujita M, Isogai S, Kudo A. Vascular anatomy of the developing medaka, *Oryzias latipes*: A complementary fish model for cardiovascular research on vertebrates. *Dev Dyn* 2006;235:734–746.
23. Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The vascular anatomy of the developing zebrafish: An atlas of embryonic and early larval development. *Dev Biol* 2001;230:278–301.
24. Hüppop K. Phänomene und Bedeutung der Energieersparnis bei dem Höhlenfisch *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Thesis, Universität Hamburg, 1988.
25. Hüppop KaW, H. Bigger eggs in subterranean *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). *Zool Syst Evolut* 1991;29: 280–288.
26. Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN, Engeszer RE. Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev Dyn* 2009;238:2975–3015.
27. Borowsky R. Restoring sight in blind cavefish. *Curr Biol* 2008;18:R23–24.
28. Protas M, Tabansky I, Conrad M, Gross JB, Vidal O, Tabin CJ, et al. Multi-trait evolution in a cave fish, *Astyanax mexicanus*. *Evol Dev* 2008;10:196–209.
29. Fishbase. <http://www.fishbase.org/search.php> (last accessed November 2011).
30. Helfman GS, Collette BB, Facey DE, Bowen BW. The diversity of fishes. Biology, evolution, and ecology. Wiley Blackwell publishers. 2009; Second Edition.

Address correspondence to:

Sylvie Rétaux, Ph.D.

UPR 3294 N&D Laboratory

Institut de Neurobiologie Alfred Fessard

CNRS

Avenue de la Terrasse

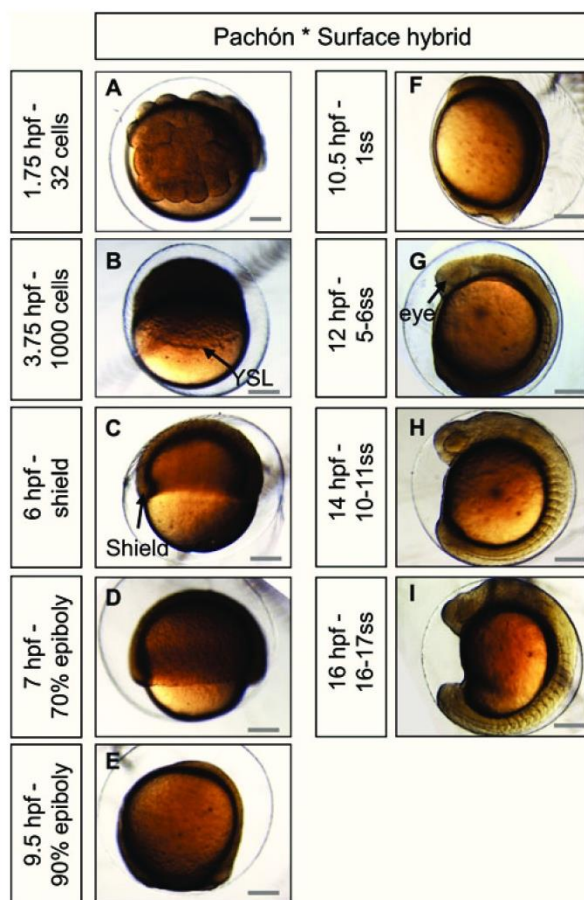
91198 Gif-sur-Yvette cedex

France

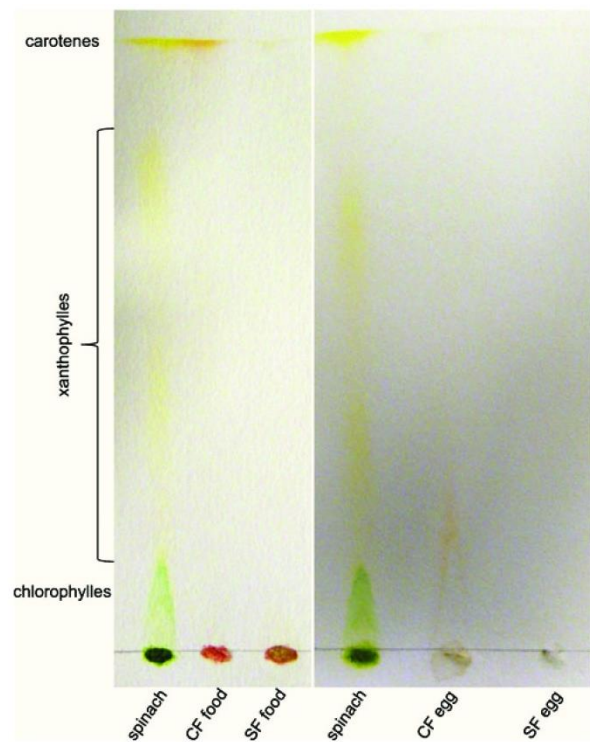
E-mail: retaux@inaf.cnrs-gif.fr

Supplementary Data

SUPPLEMENTARY VIDEO S1. Blood circulation on the yolk. Short movie of a surface fish larva, first shown at normal speed and then at half normal speed. CCV stands for common cardinal vein, also called the duct of Cuvier.



SUPPLEMENTARY FIG. S1. Development of *Astyanax mexicanus* female Pachón × male surface F1 hybrid embryos from zero to 16 hpf. (A–I) Hybrid embryos at stages indicated on the left, in lateral views (B–D) or view from the animal pole (A). The yolk syncytial layer (B), the embryonic shield (C), and the eye (G) are indicated by arrows. The scale bars represent 200 μm. Compare with Figures 3 and 4.



SUPPLEMENTARY FIG. S2 Chromatography of pigments contained in *Astyanax mexicanus* food and eggs. Spinach pigments are used as a control for migration. CF food stands for cavefish food and SF food for surface fish food (see Materials and Methods).

III. Discussion

Cette table de développement a permis de confirmer l'idée préconçue selon laquelle les SF et les CF Pachón se développent de manière synchrone (voir notamment la somitogenèse) : il est donc possible de parler d'hétérochronie lorsque certains gènes s'expriment de manière différée entre ces deux morphes. Cependant, pour les équipes travaillant sur le développement d'autres populations CF (que Pachón), il serait judicieux de vérifier que leur développement est également comparable à celui des SF.

Comme remarqué précédemment, les œufs CF Pachón ont un vitellus plus volumineux que celui des SF (Hüppop, 1988; Hüppop and Wilkens, 1991). Les CF le consomment à la même vitesse que les SF, ils peuvent donc *a priori* vivre plus longtemps sur leurs réserves vitellines.

Concernant le développement larvaire, l'*Astyanax* semble se comporter comme le poisson-zèbre (Parichy et al., 2009) : il se développe plus ou moins rapidement selon la température d'élevage et la densité de population, et c'est la longueur standard de la larve qui détermine son stade de développement plutôt que son âge. Les différents caractères morphologiques étudiés, comme la vessie natatoire ou les rayons des nageoires, se développent en fonction de la longueur standard, et de manière synchrone entre SF et CF. La seule différence détectée ici entre les 2 morphes est le nombre de rayons de la nageoire anale, qui est légèrement plus faible chez les CF adultes que chez les SF.

La croissance de l'œil est ralentie chez les CF dès les premiers stades larvaires par rapport aux SF, et quand la larve atteint 1 cm environ, l'œil ne grandit plus et régresse. Au contraire, la croissance de l'œil des SF est, comme attendu, indéfinie. Celle des hybrides SF l'est également, mais à un rythme plus faible.

Le développement précoce d'*Astyanax mexicanus* est très rapide : l'éclosion a lieu à partir de 24 hpf, contre 48 hpf chez le poisson-zèbre. En revanche, le temps de génération est du même ordre (quelques mois).

En conclusion, la disponibilité d'une table de développement participe à établir *Astyanax mexicanus* comme une espèce-modèle à part entière.

B. Développement précoce des placodes chez *Astyanax mexicanus*

I. Introduction

Le cristallin semble être une structure particulièrement intéressante pour comprendre la dégénérescence de l'œil des CF (voir introduction, partie C III c 2) : c'est la première structure qui entre en apoptose (Alunni et al., 2007), et des expériences de transplantation ont montré que cette apoptose, autonome au cristallin, était suffisante pour entraîner la dégénérescence de l'œil entier (Yamamoto and Jeffery, 2000). Or ces expériences de transplantation ont été effectuées à 24hpf. Dès ce stade, le cristallin CF a donc, de façon inhérente, des défauts qui conduisent à son entrée en apoptose à partir de 40 hpf. Ces défauts pourraient être des défauts de spécification précoce, ou de morphogenèse, ou de différenciation.

Nous avons donc décidé d'étudier dans un premier temps le développement précoce du cristallin. Le cristallin se développe à partir d'une placode, qui dérive elle-même du champ panplacodal (voir introduction, partie B II à IV). Nous nous sommes intéressés à la régionalisation du champ panplacodal, en étudiant par hybridation *in situ* des gènes marqueurs des différents territoires, et notamment de celui du cristallin.

II. Article en préparation

Sensory evolution in blind cavefish is driven by early events during gastrulation and neurulation

Hélène Hinaux¹, Gaëlle Recher², Alexandre Alié¹, Maryline Blin¹, and Sylvie Rétaux¹

¹ DECA group, N&D laboratory, CNRS UPR3294, Gif sur Yvette, France.

² BioEmergences Platform, Gif sur Yvette, France.

Introduction

Animals rely on their sensory systems to perceive biologically relevant stimuli in their environment. Natural selection favors sensory systems that are adapted to stimuli used for survival and reproduction. In line with this idea, there are numerous examples in the literature reporting sensory specialization in animals according to their habitat. This concerns both external sensory organs and brain areas which process the sensory information. However, not much is known on how existing sensory systems evolve, particularly in terms of size, to match a specific environment.

To cite a few examples, the diurnal rodents have a larger amount of cerebral cortex devoted to visual areas compared with nocturnal rodents, the latter having a larger part of their cortex devoted to somatosensory and auditory areas; and arboreal squirrels have a larger part of cortex devoted to visual processing than terrestrial rodents (Campi and Krubitzer, 2010; Krubitzer et al., 2011). Among the cichlid fish radiation in African lakes, the relative size of brain regions in different species varies according to the environment and the feeding habits (Pollen et al., 2007). At peripheral level also, sensory organs vary a lot among species. Classical cases include the small eyes but highly developed olfactory epithelium of sharks (Collin, 2012), the vibrissae-like tactile hair covering the otherwise hairless skin of the naked mole rat (Crish et al., 2003; Park et al., 2003; Sarko et al., 2011) or the variation in the number of lateral line neuromasts in sticklebacks depending

on their stream versus marine, or benthic versus limnetic habitat (Wark and Peichel, 2010).

Of note, the evolution of a particular sensory organ is often discussed with no consideration of the role played by other senses, but recent analyses have revealed co-operations and trade-offs among senses (Nummela et al., 2013). Developmentally, this implies that the control of the size of sensory organs is tightly regulated during embryogenesis and later, and that this regulation is coordinated between the different organs.

In cave animals from all phyla, a striking blind (and de-pigmented) phenotype is repeatedly observed. In the blind cavefish of the species *Astyanax mexicanus*, which can be very advantageously used in developmental comparative analyses because sighted surface fish of the same species are available (Jeffery, 2008; Jeffery, 2009), the eyes are totally absent in adults, but so-called sensory compensations have been reported: they have more taste buds (Schemmel, 1967; Varatharasan et al., 2009; Yamamoto et al., 2009), more head neuromasts (Jeffery et al., 2000; Yoshizawa et al., 2011), and their olfactory capabilities seem enhanced (Bibliowicz et al., 2013). In terms of evolution, this can be interpreted as sensory modules upon which natural selection can act, at developmental and genetic levels (Franz-Odenaal and Hall, 2006).

Importantly in *Astyanax* cavefish, the eyes first develop almost normally during embryogenesis before they secondarily degenerate (Alunni et al., 2007), and the triggering event for eye degeneration is

lens apoptosis (Yamamoto and Jeffery, 2000). But what are the developmental mechanisms involved in the regulation of sensory organ size in cavefish? Previous work has shown that increased Shh signaling and heterochronic Fgf8 signaling in cavefish have pleiotropic effects on neural development: Shh is indirectly responsible for lens apoptosis (Yamamoto et al., 2004), and also impacts the number of taste buds (Yamamoto et al., 2009). Shh and Fgf8 influence the relative sizes of the domains of the neural plate and neural tube that are fated to contribute to the retina or to other brain parts (Menuet et al., 2007; Pottin et al., 2011). These signaling systems have therefore pleiotropic effects on neural development.

Shh and Fgf are also known to affect the development of the placodal region in

other Vertebrate model species (Bailey et al., 2006; Dutta et al., 2005). The placodes are non-neural ectodermal tissues surrounding the neural plate, and that generate the sensory organs of the head in Vertebrates, such as the lens, the otic vesicles, the olfactory epithelium, or the lateral line (Streit, 2007; Streit, 2008). Here, we have investigated the development of the *Astyanax* cavefish placodal region, with a particular focus on the lens placode. We report significant differences in placodal patterning between cavefish and surface fish embryos, and we show that Shh and Fgf signaling systems coordinate the respective sizes of the lens and olfactory placodes in cavefish, therefore evidencing a trade-off between these two sensory components.

Material and methods

Animals

Laboratory stocks of *A. mexicanus* surface fish, Pachón cave fish and Molino cave fish were obtained in 2004 from the Jeffery laboratory at the University of Maryland, College Park, MD. They had been lab-raised for some generations (except for Molino fish that are wild animals), and surface fish had initially been collected in San Solomon Spring, Balmorhea State Park, Texas. In our facility, they were maintained and bred at 23°C (Pachón and Molino) and 26°C (surface) on a 12:12 hours light/dark cycle in tap water. Surface and Pachón cavefish embryos were collected after natural spawning, staged according to the developmental staging table (Hinaux et al., 2011) and fixed at various stages in 4% paraformaldehyde (PFA). After progressive dehydration in methanol, they were stored at -20°C.

Animals are treated according to the French and European regulations for handling of animals in research. SR's authorization for use of animals in research is number 91-116, and Paris Centre-Sud Ethic Committee authorization number is 2012-0052.

Eye and lens measurements

The various hybrid larvae were obtained by in vitro fertilization of SF or Pachón eggs by sperm of SF, Pachón or Molino fish (Elipot et al., 2014). They were bred at 23 °C, and photographed at 36 hpf under an Olympus SZX16 stereomicroscope. Eyeball and lens measurements were performed on the pictures using ImageJ software.

In situ hybridizations

cDNAs were amplified by PCR from pCMV-Sport6 plasmids picked from our cDNA library or from pCRII-Topo vectors using SP6 and T7 primers, and digoxigenin- riboprobes were synthesised from PCR templates. A protocol for automated whole-mount in situ hybridization (Intavis) was performed. Briefly, embryos were progressively re-hydrated, permeabilized by proteinase K (Sigma) treatment before being incubated over night at 68° in hybridization buffer containing the appropriate probe. After stringent washes, the hybridized probes were detected by immunohistochemistry using an alkaline phosphatase-conjugated antibody against digoxigenin (Roche) and a NBT/BCIP chromogenic substrate (Roche). After staining, embryos were photographed in toto, always in the same orientation, under a Nikon AZ100 stereomicroscope using agarose wells. Some were embedded in paraffin and sectioned (8 µm). Sections were counterstained with DAPI, using Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen).

For fluorescent double in situ hybridization, Cy3- and FITC-tyramides were prepared as described (Zhou and Vize, 2004). Embryos were incubated with antibody anti-FITC-POD (Roche, 1/250), washed in PBS/Tween 0.1% (PBST) and incubated for 20 minutes at room temperature with FITC tyramide at 1/400. Tyramides were activated by H2O2 (Sigma, 0.001%) for 60 minutes and washed again in PBST. The first peroxidase conjugate was inactivated by incubation in 3% H2O2 for 30 minutes. Embryos were washed in PBST and

incubated with the second antibody (anti-digoxigenin-POD, Roche, 1/250). The same protocol was applied for the Cy3-tyramide revelation. Embryos were either imaged with an Olympus SZX16 stereomicroscope or with an Apotome microscope (Zeiss).

Pharmacological treatments

Cavefish embryos were collected early, and their chorion was removed manually. They were incubated in 100 μ M cyclopamine (C-8700, LC Laboratories) or 0.5 μ M SU5402 (215543-92-3, Calbiochem) diluted in blue water (0.017 M NaCl, 4.02.10⁻⁴ M KCl, 2.72.10⁻⁴ M CaCl₂, 6.5.10⁻⁴ M MgSO₄, methylene blue) from 6 to 10 hpf. Controls were incubated in an equivalent concentration of ethanol or DMSO, respectively. They were then washed in blue water, grown at 23 °C and fixed either at 16 or at 28 hpf for in situ hybridization.

Laser ablation

SF embryos were collected at 6 hpf and incubated in Bodipy 505/515 (D3921, Invitrogen) 60 μ M diluted in Embryomedium (EM) for 1 hour after chorion removal. They were then washed in EM, and grown at 23 °C until 12 hpf. They were then mounted laterally in agarose (1% in EM, SIGMA) wells, one optic vesicle facing the objective.

Imaging was conducted with a custom-made upright two-photon Leica microscope (DM6000 stand, SP5 scan head) coupled with a Maitai femtosecond infrared laser (Spectraphysics).

First a non-invasive imaging acquisition was made (laser tuned at 900 nm, low power, low magnification, no averaging) to

localize large cells in the surface ectoderm overlying the optic vesicle (putative lens precursor cells).

The ablation step consisted in scanning these large cells at shorter wavelength repetitively (laser tuned at 860 nm, high power, high magnification, and high averaging rate). When deleterious effect started to be visible (cavitation bubbles formation), ablation step was stopped. Note that some parameters (scanning speed, averaging, duration of the ablation) were strongly dependent on the sample and were adapted to each sample, since the effective ablation is reproducible (same number of cells ablated and no obvious surrounding damage).

After ablation, they were grown in EM with PTU (N-Phenylthiourea, P7629, SIGMA, 1/1000 of stock solution at 3% in Ethanol) overnight at 23 °C, incubated again 1 hour in Bodipy 505/515, washed in EM, and their eyes were imaged upon two-photon excitation to assess the size of the lens and the retina.

They were then fixed in PFA 4% at 60 hpf for TUNEL assay (Promega).

4D imaging

Astyanax eggs were obtained by in vitro fertilization (Elipot et al., 2014), and injected at one cell stage with a mix of mRNAs at 100 ng/ μ L, encoding H2B-mCherry and Ras-EGFP. When they reached 6 hpf, embryos were sorted to remove any abnormal phenotype and to choose the most fluorescent ones. These were mounted in custom-made Teflon molds at 9-10 hpf and maintained with low melting agarose (0.4%, low melt agarose, 6351.5, ROTH), future head facing the objective, in a medium containing PTU

(1/1000 of stock solution at 3% in Ethanol) and tricain (A5040, SIGMA, 1/10 of stock solution at 0.4% in water).

They were then imaged upon two photon excitation on upright stands (Leica DM6000 and DM5000 stands with SP5 scan head, and Zeiss Axio Examiner stand with LSM780 scan head and GaAsP spectral detection; Lasers for Leicas: t-pulse (Amplitude System) at 1030 nm, and Maitai (Spectraphysics) tuned at 980 nm; Laser for Zeiss: Chameleon XR (Coherent) tuned at 810 nm).

Acquisition lasted for 15-20 hours while temperature was maintained at 23 °C (OKO-Lab system). Beam was focused on the samples with the following objectives: Leica 1.0 NA 20X W (HCX APO), Olympus 0.95 NA 20W W (XLUMPlanFluo) and Nikon 1.1 NA 25X (CFI Apo LWD). Fluorescence was epicolllected and directed to the detectors (Hybrid units for the Leicas, and GaAsP spectral module for the Zeiss) and selected with bandpass filters (Leicas: 525/50 nm

(EGFP), 610/75 nm or 585/40 nm (mCherry)) and tunable filters for the Zeiss). Excitation 980 or 1030 nm 42-88mW; scan speed 300-1200 Hz; frame average 1-2; zoom 1-1.5; 512*512 pixel at 0.9-1.2 µm wide. A full z-stack was compiled in 2-4 minutes.

After imaging, embryos were removed from the molds and checked for damages.

After acquisition, raw images were converted into VTK format and uploaded on the BioEmergences workflow (<http://bioemergences.iscpif.fr/workflow/>) to be stored and processed. A first algorithm detected the centers of nuclei, followed by a second that tracked the detected cells to reconstruct lineage trees. Visualization of raw and reconstructed data, tracking correction and validation, statistics processing and visualization were realized with the custom-made Mov-IT software (developed by BioEmergences, UPS 3674) (Olivier et al., 2010). Cell tracking was manually corrected.

Results

Insights from SF×CF genetic crosses.

The eye in vertebrates has two main components, the neural retina and the lens. In *Astyanax* cavefish, genetic evidence from QTL studies using adult F2 hybrid individuals after SF×CF crosses suggests that the size of these two eye components are controlled by different loci (Protas et al., 2007; Wilkens, 1988). Here, to explore a possible early developmental origin in

the lens and eye size differences between CF and SF, we measured lens and eyeball sizes in 36 hpf F1 hybrid larvae resulting from various crosses (**Fig. 1A**). At such early stage, shortly after hatching (Hinaux et al., 2011), the lens size, the eyeball size, and the lens/eyeball size ratio vary among the different F1 larvae (**Fig. 1B**). This shows that the reductions in lens size and in eye size in cavefish are controlled by 1) independent and 2) early embryonic mechanisms. We next focused on the control of the size of the lens component.

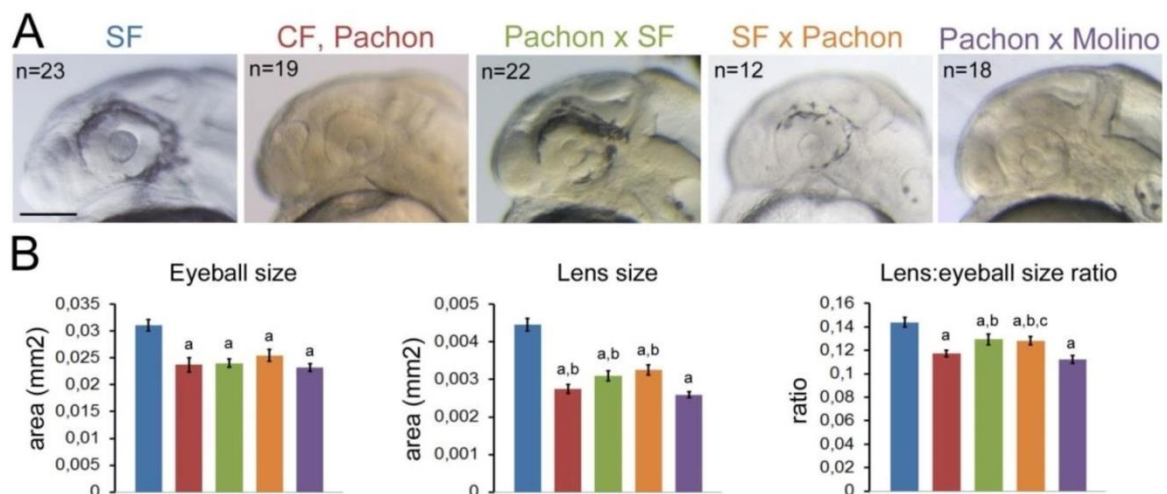


Figure 1: lens size and eye size are controlled by independent and early mechanisms.

A, Photographs of the head of 36hpf individuals from SF, CF and F1 hybrids as indicated. For hybrids, the first name given is the origin of the female used in the cross. Scale bar: 100µm.

B, Histograms showing lens and eyeball measurements and lens:eyeball ratios in various 36hpf larvae. Color code as in A. SF, blue; Pachón, red; Pachón × SF, green; SF × Pachón, orange; Pachón × Molino, purple. Significant differences are indicated: a, different from SF ($p < 0.01$ to $p < 0.0001$); b, different from Pachón × Molino ($p < 0.05$ to $p < 0.001$); c, different from Pachón ($p < 0.05$), Mann Whitney tests.

Early patterning of the placodal field in cavefish.

The lens, like other sensory organs of the head in vertebrates, derives from a

placode, i.e., a non-neural ectodermal tissue. We therefore examined the patterning of the placodal field in CF at the end of gastrulation/beginning of neurulation (10 hpf), by comparison to SF

embryos which serve as “wild-type” controls (**Fig. 2**). At this stage, the global shape and size of the neural plate border domain labelled by *Dlx3b* was similar in SF and CF (**Fig. 2AA'**). Inside this *Dlx3b*-positive border, the anterior neural plate markers *Zic1* and *Pax6* which label the “eyefield” and presumptive forebrain are prominently expressed (**Fig. 2B-C'**), with midline differences that relate to the absence of ventral quadrant in the CF retina, confirming our previous results (Pottin et al., 2011). Moreover, at placodal level, inside the *Dlx3* border domain, the

presumptive lens placode territory labelled by *Pax6* was much smaller in length (A-P extension) in CF embryos, which lack the anterior-most part of the *Pax6*-positive placodal expression domain (**Fig. 2C-C'**). The width (medio-lateral extension) of the *Pax6* lens placode domain was similar in SF and CF, consisting of 2-3 cells diameters (**Fig. 2C-D'**). Thus, early anterior placodal patterning is modified in cavefish embryos at the end of gastrulation, and the size of the lens placode is affected.

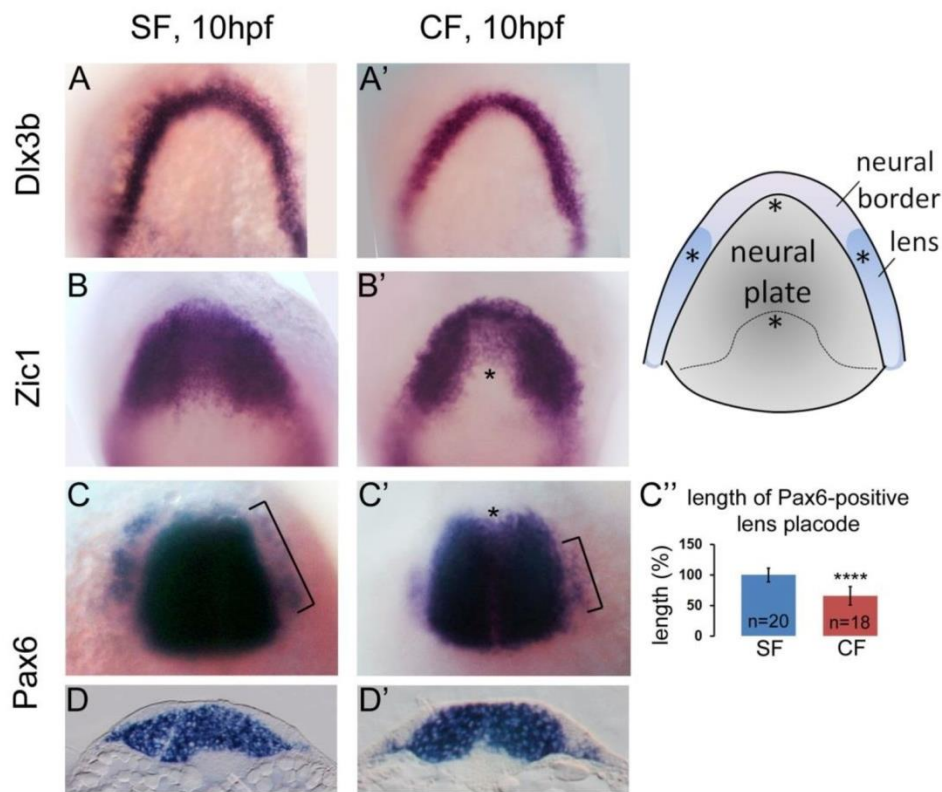


Figure 2: early patterning of the anterior placodes and neural plate at 10hpf.

AA' to DD', Photographs of SF (left) and CF (right) 10hpf embryos showing expression of the indicated genes. A to C' show dorsal views. DD' show transverse sections. E to F' show frontal views. GG' show sagittal confocal projections. The scheme on the right helps the interpretation of gene expression patterns. Asterisks indicate spatial differences between SF and CF.

C'', Histogram showing quantification of gene expression domains in SF (blue) and CF (red) 10hpf embryos. Data are mean±s.e.m. Significant differences are indicated: ****p<0.0001, Mann Whitney test.

Slightly later at 12 hpf (end of neurulation) and 16 hpf (mid-somitogenesis), *Dlx3b* expression was progressively reduced to the presumptive olfactory and otic placode and to the casquette (**Fig. 3A-B'**). Notably, at these stages, the *Dlx3b*-negative ventro-lateral head region corresponding to the forming eye vesicle was reduced in CF (**Fig. 3AA''**), but the *Dlx3b*-positive dorso-lateral domain corresponding to the olfactory placode was much larger in CF (**Fig. 3BB''**). This latter result was confirmed using the olfactory-specific marker *Eya2* (**Fig. 3CC''**).

From 20 hpf onwards, the lens mass could be clearly identified using *Pitx3* expression (**Fig. 3D-E'** and **Suppl. Fig. 1ABC**). At these stages, *Pitx3* is expressed throughout the lens mass in both SF and CF (**Fig. 3FG**); therefore *Pitx3* expression area is a good proxy of the lens size. From 20 hpf to 28 hpf, the *Pitx3*-positive lens area was much smaller in CF than in SF embryos (**Fig. 3D''E''** and **Suppl. Fig1B**). The

formation of the lens mass and its delamination from the surface ectoderm, visible on dorsal views (insets in **Fig. 3EE'**) and sections, was comparable in SF and CF embryos.

Finally, the size of the olfactory epithelium derived from the olfactory placode was assessed at 36 hpf using OMP (olfactory marker protein, **Fig. 3HH'**). The area of the nose/olfactory epithelium where OMP-positive neurons are scattered in a salt and pepper pattern was much larger in CF than in SF (**Fig. 3H''**).

Altogether, these patterning data open the possibility that the lens placode and mass (identified at 10 hpf using *Pax6* and from 20hpf onwards using *Pitx3*) is continuously reduced in CF, at the expense of an enlargement of the olfactory placode (identified using *Dlx3b* and *Eya2* at early stages and OMP at later stages). Of note, posterior placodes such as the otic placode were identical in size in CF and SF (**Suppl. Fig. 1D**), suggesting that only the anterior placodal region is modified in CF.

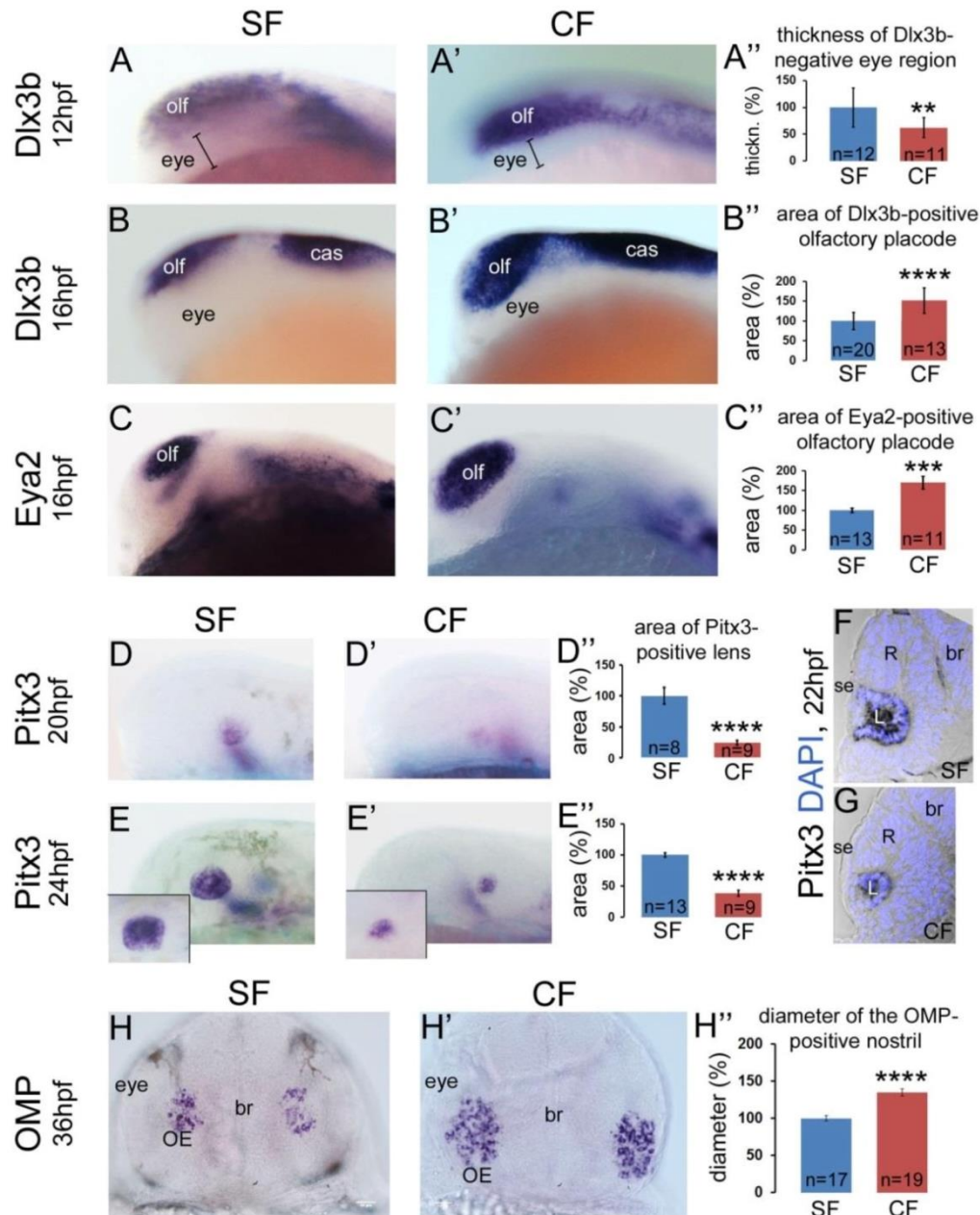


Figure 3: late patterning of the anterior placodes.

AA' to HH', Photographs of SF (left) and CF (right) embryos showing expression of the indicated genes at the indicated stage. A to E' show lateral views; anterior to the left. HH' show frontal views. F and G show sections through the eyes, with DAPI (blue) counterstain to visualize nuclei.

A'' to H'', Histograms showing quantification of gene expression domains in SF (blue) and CF (red) embryos and larvae. A'' to E'' were measured on lateral views, and H'' were measured on frontal views. Data are mean \pm s.e.m. Significant differences are indicated: **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001), Mann Whitney tests.

br, brain; cas, casquette; L, lens; OE, olfactory epithelium; olf, olfactory placode; R, retina; se, surface ectoderm.

Signaling systems and the control of placodal patterning and fate in cavefish.

We next sought to investigate the origin of the modifications of placodal patterning in cavefish. Differences being observed as early as 10 hpf suggested that they resulted from modifications during gastrulation events. Since Shh hypersignaling and Fgf8 heterochronic (earlier) expression are well described in CF (Pottin et al., 2011; Yamamoto et al., 2004), and since these signaling systems have known roles in panplacodal field patterning in model species (Dutta et al., 2005; Glavic et al., 2004; Streit, 2004; Toro and Varga, 2007), we first investigated the potential impact of these signaling modifications on CF placodal development. Cavefish embryos were treated with cyclopamine (an antagonist of the Shh receptor Smoothened (Chen et al., 2002)) or with SU5402 (an antagonist of Fgf receptor signaling (Mohammadi et al., 1997)) between 6 hpf (shield) and 10 hpf (end of gastrulation), and the respective sizes of their lens and olfactory placodes were measured.

Treatment with cyclopamine 100 μ M resulted in a 19% increase in lens size (as measured at 28hpf using Pitx3 marker) (**Fig. 4A-A''** and **B**) when compared to control CF and vehicle-treated CF. Preliminary experiments suggest that inhibition of Fgf signaling with 0.5 μ M SU5402 also affected lens size, probably in an opposite manner (**Fig. 4B**; these data are currently confirmed; see also (Pottin et al., 2011): a treatment with SU 5402 2 μ M between 8 and 12hpf reduces lens size). This suggests that Shh hyper-signaling during gastrulation in CF is (at least in part) responsible for the small size of the lens placode.

Ongoing experiments are currently assessing the roles of these two signaling systems on the olfactory placode size, as measured at 16hpf using Eya2 as a marker. The first experiments suggest that the two inhibitors (cyclopamine and SU5402) reduce the size of the olfactory placode (not shown).

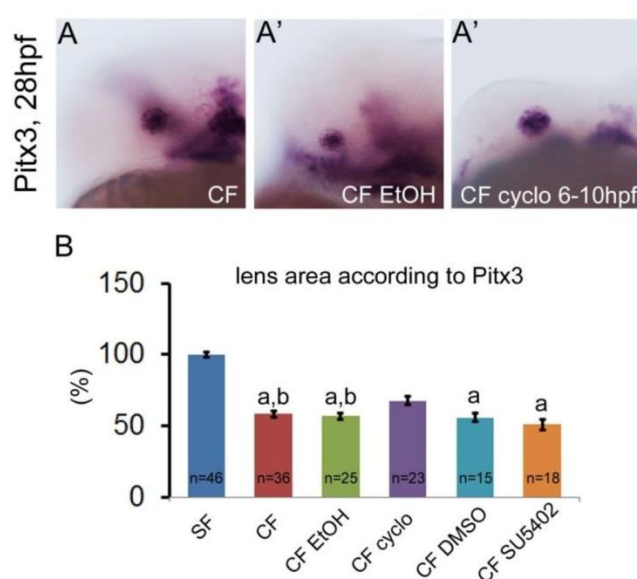


Figure 4: impact of early signaling systems on lens size in cavefish.

A to A'', Photographs of CF embryos showing the Pitx3-expressing lens at 28 hpf, after the indicated treatment. Lateral views, anterior to the left.

B, Histograms showing quantification of lens size according to Pitx3 staining, as measured on lateral views. Ethanol and DMSO (vehicles for cyclopamine and SU5402 treatments, respectively) had no effect on lens size. Data are mean \pm s.e.m. Significant differences are indicated: a, different from SF ($p < 0.0001$); b, different from CF treated with cyclopamine ($p < 0.05$ to $p < 0.01$); Mann Whitney tests.

These experiments suggest that early, qualitative and quantitative, Shh and Fgf signaling changes modify the patterning of the panplacodal field and the size of presumptive sensory placodes in CF embryos.

Reduced lens size in cavefish: a role of the community effect in lens apoptosis?

The molecular events controlling lens placode and lens cell identity seem normal in cavefish (present data, Jeffery et al., 2000; Jeffery and Martasian, 1998; Strickler et al., 2007). At the onset of lens apoptosis around 40-42 hpf (Alunni et al., 2007), the main and obvious difference between the CF and the SF lens is the size. We therefore sought to test whether the CF lens suffers from a defect in the so-called community effect, defined as interactions among a group of many nearby precursor cells that are necessary for coordinated differentiation, and for which a threshold size of the cell population is necessary (Bolouri and Davidson, 2010; Saka et al., 2011).

To test this hypothesis, we performed laser ablation of lens placode cells at 12-14 hpf on SF embryos, to mimic the small lens component of CF (**Fig. 5A**). One day later, at 36 hpf, this resulted in a reduction in lens size ranging from -70% to -15%, depending on the extent of ablation on the laser-treated side. Importantly, laser ablation specifically affected the size of the lens, without affecting the size of the retina part of the eye (n=17, **Fig. 5AB**). Ablated SF larvae were grown up to 60 hpf, a stage where apoptosis is massive in the lens (and also in the retina) in CF (**Fig. 5C**, left). However in laser-treated SF, while the lens was still reduced in size at 60 hpf, the morphology and cytoarchitecture of the lens epithelium, lens fiber cells and retina were normal, and apoptotic cells were as rare as in the non-operated side, even in the most severely ablated embryos (**Fig. 5C**, middle and right). These results suggest that an absence of community effect among a small number of lens cells in CF is not sufficient to cause their apoptotic degeneration.

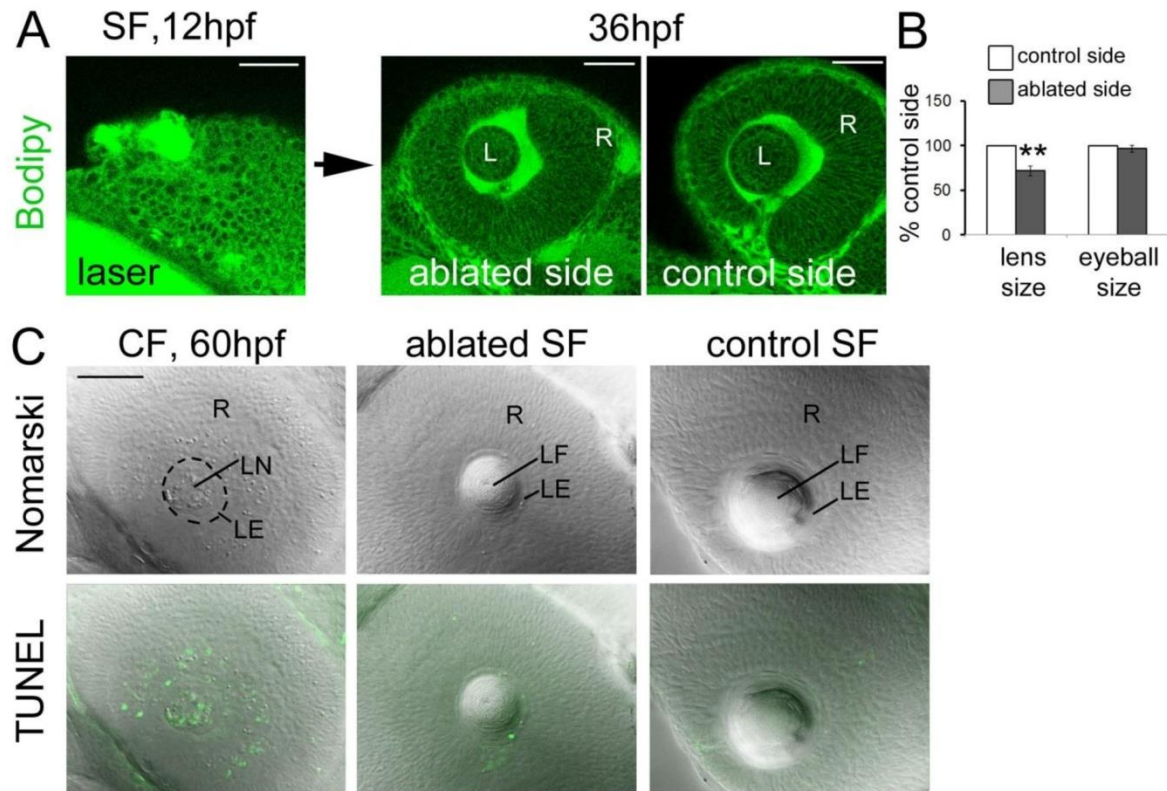


Figure 5: diminishing lens size in SF does not cause apoptosis.

A, Confocal images showing laser ablation of the lens placode in SF embryos at 12 hpf and the resulting anatomy of the eye 24 hours later. Embryos were stained with Bodipy 505/515. L, lens; R, retina. Scale bars, 50 μ m.

B, Histogram showing quantification of lens and eye size after ablation and in the contra-lateral un-operated side. Data are mean \pm s.e.m. Significant differences are indicated: **p=0.0051; Wilcoxon test.

C, Photographs of the eyes of 60 hpf larvae in the indicated conditions, after TUNEL staining (green fluorescence). Top images show Nomarski images to assess anatomy and cytoarchitecture, and bottom images show the merged TUNEL fluorescent staining. LF, lens fibers; LE, lens epithelium; LN, lens nucleus. Scale bar, 50 μ m.

Lens defect in cavefish: a role of morphogenesis or cell lineage dynamics?

The above results tend to suggest that the CF lens does not suffer from an early specification defect (factors such as *Dlx3b*, *Pax6*, *Pitx3* are normally expressed) nor from a size problem (absence of community effect). On the other hand, our recent results also show that lens differentiation, as followed by the

expression of crystallins, is also mostly normal (Hinaux et al., xxxx). In our search for the developmental defect that could be the cause of lens apoptosis in CF, we next hypothesized a possible problem in lens morphogenesis or in the dynamics of lens cell lineages. To investigate this point, we set out to perform 4D two-photon live imaging of SF and CF embryos previously injected at the one cell stage with H2B-

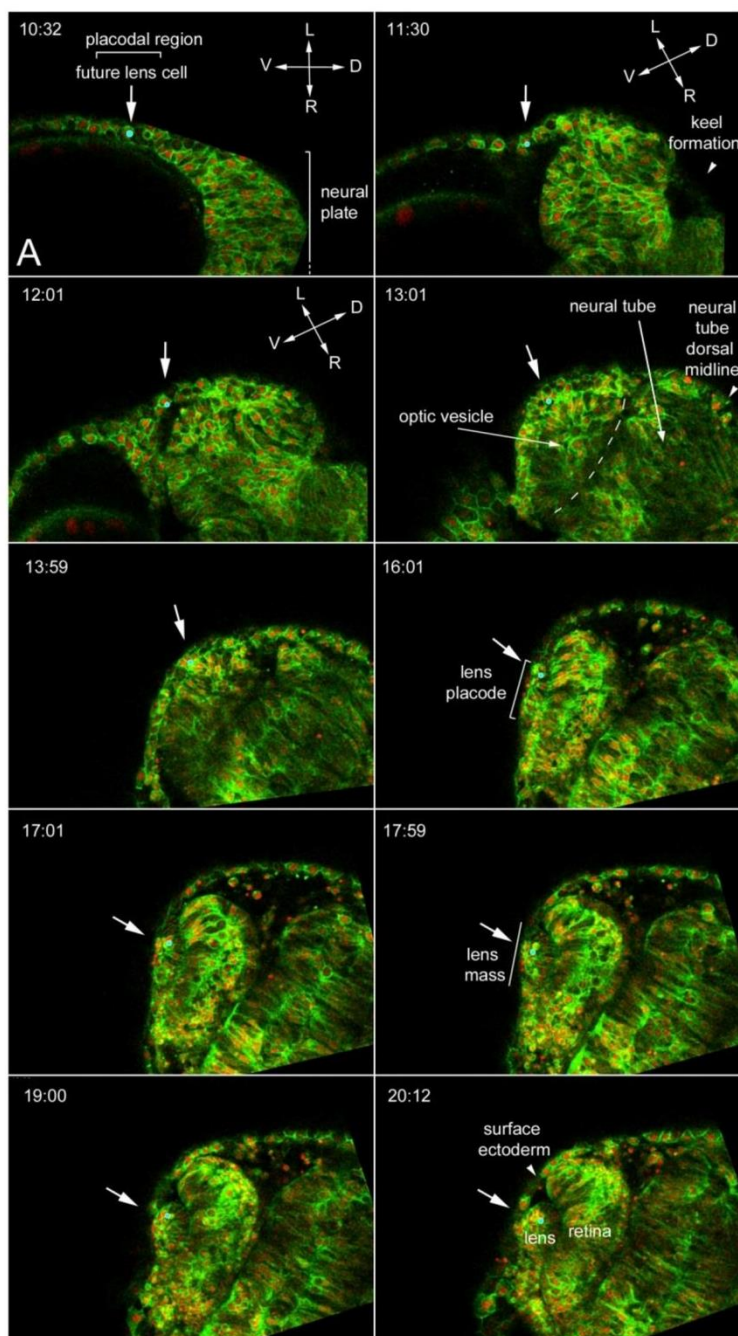
mCherry and Ras-GFP mRNAs to label nuclei and membranes, respectively.

On the resulting movies, lens cells were tracked from placodal stage (~10 hpf) to lens ball stage (~20 hpf). An example is given for a SF embryo in **Figure 6A**. Before neurulation, and consistently with result using Pax6 as a marker of the presumptive lens region (**Fig.2CC'**), the future lens cells are located laterally to the neural tube. As neurulation proceeds and as the keel is formed, the lateral ectoderm is moved dorsally, with an apparent movement dorsal-ward. This results in the positioning of the future lens cells in front of the forming eye vesicle (itself evaginating from the neural tube). At 16 hpf, the typical thickening of the placode stage is recognizable, and the lens placode is now composed of rectangular, parallel and elongated cells. At 17-18 hpf, several layers are visible and the lens mass is

thickening. At 20 hpf, the connection with the surface ectoderm is lost, and the lens displays a spherical shape.

In the meantime, we have also followed cell divisions (**Fig. 6B**). The future lens cell shown in Fig. 6A undergoes mitosis at 10.6 hpf (10h40), in the preplacodal region. The two sister cells then stay in the vicinity of each other, although they are not closest neighbors, for several hours. They then divide again, almost synchronously, at 17.1 hpf (17h06) and 17.5 hpf (17h30) respectively, in the lens mass, where the four resulting clonally-related cells are very close. The cell cycle time of this lens cell is therefore about 6h30 during the developmental period.

We are currently accumulating data to analyze quantitatively the behavior of individual lens precursor cells and to compare this behavior in SF and CF embryos.



B

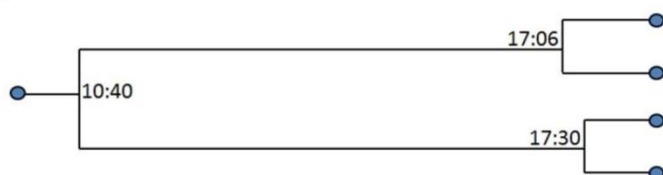


Figure 6: analyzing the behavior of individual lens precursor cells.

A, two-photon time-lapse imaging of lens morphogenesis in a SF embryo. Nuclei are red and membranes are green. A future lens cell (blue dot) pointed by a white arrow is followed during 10 hours, from the pre-placodal region to the lens mass in the formed eye. The time indicated corresponds to developmental time (hpf). The orientation of the embryo is given in the first panels (the embryos rotates slightly during acquisition), and the images are annotated in concordance with the text.

B, lineage tree of the cell followed in A, with indication of the time when mitoses occurred (time is not to scale).

Additional data on the possible role of prechordal plate modifications in cavefish

The prechordal plate (pcp) is a structure from endo-mesodermal origin with important signaling properties implicated in induction and patterning of the forebrain (Kiecker and Niehrs, 2001). At the end of gastrulation, the pcp abuts the anterior limit of the embryonic axis, being just rostral to the Shh-expressing notochord and just ventral to the Dlx3b- and Fgf8-expressing anterior neural border. We reasoned that, as the latter signaling systems are “modified” in CF, pcp signaling might also be different in CF when compared to SF. Indeed, the pcp is another signaling centers that is located in the right place and at the right time to account for the patterning differences we have observed in the anterior placodal region of CF embryos.

We have previously reported Bmp4 expression in the *Astyanax* pcp, which can be subdivided into posterior prechordal

plate (ppcp) and polster (pol), at 10 hpf (Pottin et al., 2011). We therefore compared Bmp4 expression in SF and CF embryos in the pol and ppcp between SF and CF embryos between 9.5 hpf and 11 hpf (**Fig. 7A**). In SF, Bmp4 was expressed either in pol only (majority of embryos) or in pol+ppcp (**Fig. 7ABC**). Conversely in CF, a majority of embryos showed expression restricted to the ppcp only, and confocal examination confirmed the absence of Bmp4 expression in the polster zone for the majority of them (white asterisk on **Fig. 7B**). Of note, the polster as a structure is not absent in CF, as a few CF embryos did show some Bmp4 staining in the pol (**Fig. 7C**), and as expression of Pitx1 was fully comparable in SF and CF at this level (**Fig. 7D**). Thus, significant differences (Fisher tests, see figure legend) in the dynamics of Bmp4 expression exist between CF and SF. The impact of such a difference on placodal development will have to be tested.

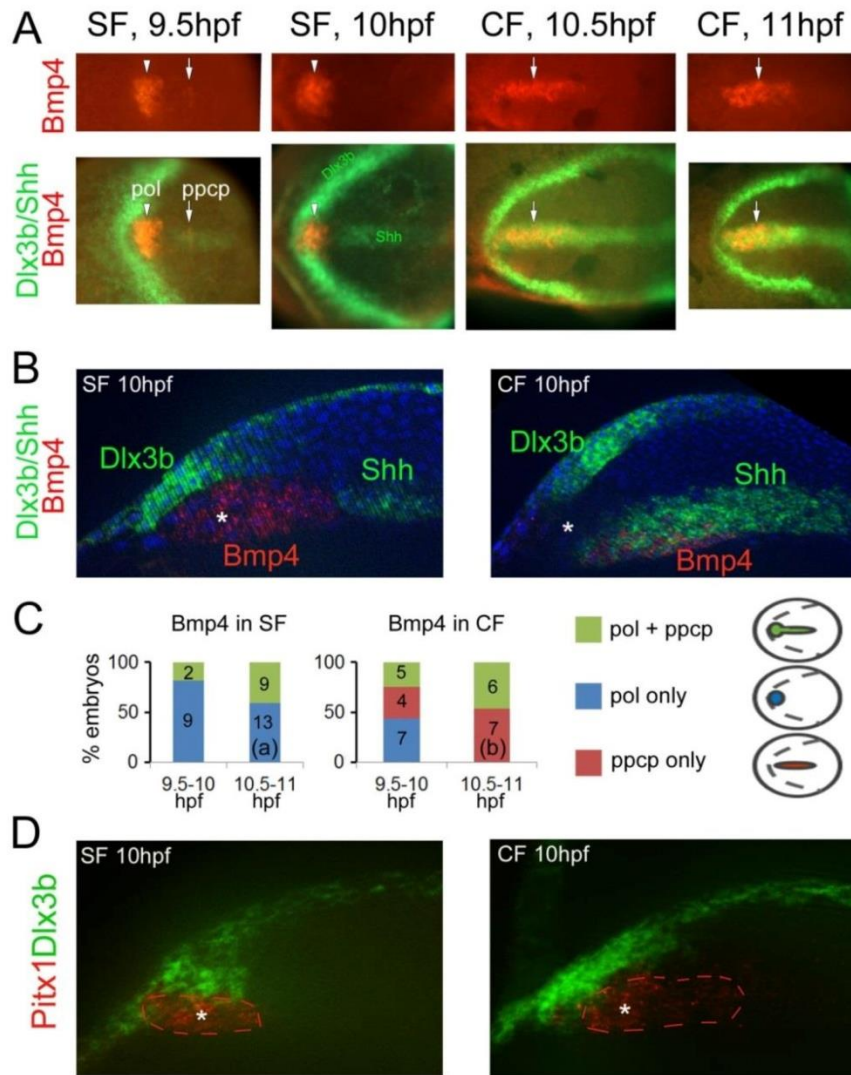


Figure 7: Bmp4 signaling from the polster and prechordal plate.

A, expression of Bmp4 between 9.5 hpf and 11 hpf in SF and CF embryos after triple ISH for Bmp4 (red), Dlx3b (green) and Shh (green). The top photos show dorsal views of Bmp4 expression on indicated embryos, in the polster (pol, arrowhead) and posterior prechordal plate (ppcp, arrow) region. The bottom photos show merged images of the entire neural plate. Dlx3b labels the neural plate border, and Shh is expressed at the ventral midline (ppcp and notochord).

B, confocal section through the saggital plane of a SF (left) and a CF (right) embryo at 10 hpf after triple ISH for Bmp4 (red), Dlx3b (green) and Shh (green), showing exclusive or overlapping expression domain between the 3 genes. The white asterisk indicates the localization of the polster.

C, distribution of Bmp4 expression pattern types in SF and CF. Color codes represent the patterns schematized on the right and numbers in bars give the numbers of embryos examined. The distribution is significantly different between the two morphs at 10.5-11 hpf (a, $p=0.0006$ for expression in polster only in SF versus CF; b, $p=0.00026$ for expression in ppcp only in SF versus CF; Fisher exact test).

D, confocal section through the saggital plane of a SF (left) and a CF (right) embryo at 10hpf after double ISH for Pitx1 (red) and Dlx3b (green). The white asterisk indicates the localization of the polster. The red dotted line outlines the Pitx1 expression domain.

References

- Alunni, A., Menuet, A., Candal, E., Penigault, J. B., Jeffery, W. R. and Retaux, S. (2007).** Developmental mechanisms for retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *J Comp Neurol* **505**, 221-33.
- Bailey, A. P., Bhattacharyya, S., Bronner-Fraser, M. and Streit, A. (2006).** Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Dev Cell* **11**, 505-17.
- Bibliowicz, J., Alie, A., Espinasa, L., Yoshizawa, M., Blin, M., Hinaux, H., Legendre, L., Pere, S. and Retaux, S. (2013).** Differences in chemosensory response between eyed and eyeless *Astyanax mexicanus* of the Rio Subterraneo cave. *Evodevo* **4**, 25.
- Bolouri, H. and Davidson, E. H. (2010).** The gene regulatory network basis of the "community effect," and analysis of a sea urchin embryo example. *Dev Biol* **340**, 170-8.
- Campi, K. L. and Krubitzer, L. (2010).** Comparative studies of diurnal and nocturnal rodents: differences in lifestyle result in alterations in cortical field size and number. *J Comp Neurol* **518**, 4491-512.
- Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K. and Beachy, P. A. (2002).** Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* **16**, 2743-8.
- Collin, S. P. (2012).** The neuroecology of cartilaginous fishes: sensory strategies for survival. *Brain Behav Evol* **80**, 80-96.
- Crish, S. D., Rice, F. L., Park, T. J. and Comer, C. M. (2003).** Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats I: vibrissa-like body hairs comprise a sensory array that mediates orientation to tactile stimuli. *Brain Behav Evol* **62**, 141-51.
- Dutta, S., Dietrich, J. E., Aspöck, G., Burdine, R. D., Schier, A., Westerfield, M. and Varga, Z. M. (2005).** *pitx3* defines an equivalence domain for lens and anterior pituitary placode. *Development* **132**, 1579-90.
- Elipot, Y., Legendre, L., Père, S., Sohm, F. and Retaux, S. (2014).** *Astyanax* transgenesis and husbandry: how cavefish enters the lab. *Zebrafish* submitted.
- Franz-Odenaal, T. A. and Hall, B. K. (2006).** Modularity and sense organs in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Evol Dev* **8**, 94-100.
- Glavic, A., Maris Honore, S., Gloria Feijoo, C., Bastidas, F., Allende, M. L. and Mayor, R. (2004).** Role of BMP signaling and the homeoprotein Iroquois in the specification of the cranial placodal field. *Dev Biol* **272**, 89-103.
- Hinaux, H., Blin, M., Fumey, J., Legendre, L., Casane, D. and Retaux, S. (xxxx).** Lens defects in *Astyanax mexicanus* cavefish: focus on crystallin evolution and function. *Developmental Neurobiology* submitted.
- Hinaux, H., Pottin, K., Chalhoub, H., Pere, S., Elipot, Y., Legendre, L. and Retaux, S. (2011).** A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachon cavefish. *Zebrafish* **8**, 155-65.
- Jeffery, W., Strickler, A., Guiney, S., Heyser, D. and Tomarev, S. (2000).** Prox 1 in eye degeneration and sensory organ compensation during development and evolution of the cavefish *Astyanax*. *Dev Genes Evol* **210**, 223-30.
- Jeffery, W. R. (2008).** Emerging model systems in evo-devo: cavefish and microevolution of development. *Evol Dev* **10**, 265-72.
- Jeffery, W. R. (2009).** Chapter 8. Evolution and development in the cavefish *Astyanax*. *Curr Top Dev Biol* **86**, 191-221.
- Jeffery, W. R. and Martasian, D. P. (1998).** Evolution of eye regression in the cavefish *Astyanax*: apoptosis and the Pax-6 gene. *Amer. Zool.* **38**, 685-96.

- Kiecker, C. and Niehrs, C.** (2001). The role of prechordal mesendoderm in neural patterning. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 27-33.
- Krubitzer, L., Campi, K. L. and Cooke, D. F.** (2011). All rodents are not the same: a modern synthesis of cortical organization. *Brain Behav Evol* **78**, 51-93.
- Menuet, A., Alunni, A., Joly, J. S., Jeffery, W. R. and Retaux, S.** (2007). Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development* **134**, 845-55.
- Mohammadi, M., McMahon, G., Sun, L., Tang, C., Hirth, P., Yeh, B. K., Hubbard, S. R. and Schlessinger, J.** (1997). Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* **276**, 955-60.
- Nummela, S., Pihlstrom, H., Puolamaki, K., Fortelius, M., Hemila, S. and Reuter, T.** (2013). Exploring the mammalian sensory space: co-operations and trade-offs among senses. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **199**, 1077-92.
- Olivier, N., Luengo-Oroz, M. A., Duloquin, L., Faure, E., Savy, T., Veilleux, I., Solinas, X., Debarre, D., Bourguine, P., Santos, A. et al.** (2010). Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy. *Science* **329**, 967-71.
- Park, T. J., Comer, C., Carol, A., Lu, Y., Hong, H. S. and Rice, F. L.** (2003). Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats: II. Peripheral structures, innervation, and selective lack of neuropeptides associated with thermoregulation and pain. *J Comp Neurol* **465**, 104-20.
- Pollen, A. A., Dobberfuhl, A. P., Scace, J., Igulu, M. M., Renn, S. C., Shumway, C. A. and Hofmann, H. A.** (2007). Environmental complexity and social organization sculpt the brain in Lake Tanganyikan cichlid fish. *Brain Behav Evol* **70**, 21-39.
- Pottin, K., Hinaux, H. and Retaux, S.** (2011). Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* **138**, 2467-76.
- Protas, M., Conrad, M., Gross, J. B., Tabin, C. and Borowsky, R.** (2007). Regressive evolution in the Mexican cave tetra, *Astyanax mexicanus*. *Curr Biol* **17**, 452-4.
- Saka, Y., Lhoussaine, C., Kuttler, C., Ullner, E. and Thiel, M.** (2011). Theoretical basis of the community effect in development. *BMC Syst Biol* **5**, 54.
- Sarko, D. K., Rice, F. L. and Reep, R. L.** (2011). Mammalian tactile hair: divergence from a limited distribution. *Ann N Y Acad Sci* **1225**, 90-100.
- Schemmel, C.** (1967). Vergleichende Untersuchungen an den Hautsinnesorganen ober- und unter-irdisch lebender *Astyanax*-Foramen. *Z Morph Tiere* **61**, 255-316.
- Streit, A.** (2004). Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Dev Biol* **276**, 1-15.
- Streit, A.** (2007). The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. *Int J Dev Biol* **51**, 447-61.
- Streit, A.** (2008). The cranial sensory nervous system: specification of sensory progenitors and placodes.
- Strickler, A. G., Byerly, M. S. and Jeffery, W. R.** (2007). Lens gene expression analysis reveals downregulation of the anti-apoptotic chaperone alphaA-crystallin during cavefish eye degeneration. *Dev Genes Evol* **217**, 771-82.
- Toro, S. and Varga, Z. M.** (2007). Equivalent progenitor cells in the zebrafish anterior preplacodal field give rise to

adenohypophysis, lens, and olfactory placodes. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 534-42.

Varatharasan, N., Croll, R. P. and Franz-Odenaal, T. (2009). Taste bud development and patterning in sighted and blind morphs of *Astyanax mexicanus*. *Dev Dyn* **238**, 3056-64.

Wark, A. R. and Peichel, C. L. (2010). Lateral line diversity among ecologically divergent threespine stickleback populations. *J Exp Biol* **213**, 108-17.

Wilkens, H. (1988). Evolution and genetics of epigeal and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the neutral mutation theory. In: *Hecht, MK, Wallace, B (Eds). Evolutionary Biology vol. 23. Plenum, New York and London*, 271-367.

Yamamoto, Y., Byerly, M. S., Jackman, W. R. and Jeffery, W. R. (2009). Pleiotropic functions of embryonic sonic hedgehog expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Dev Biol* **330**, 200-11.

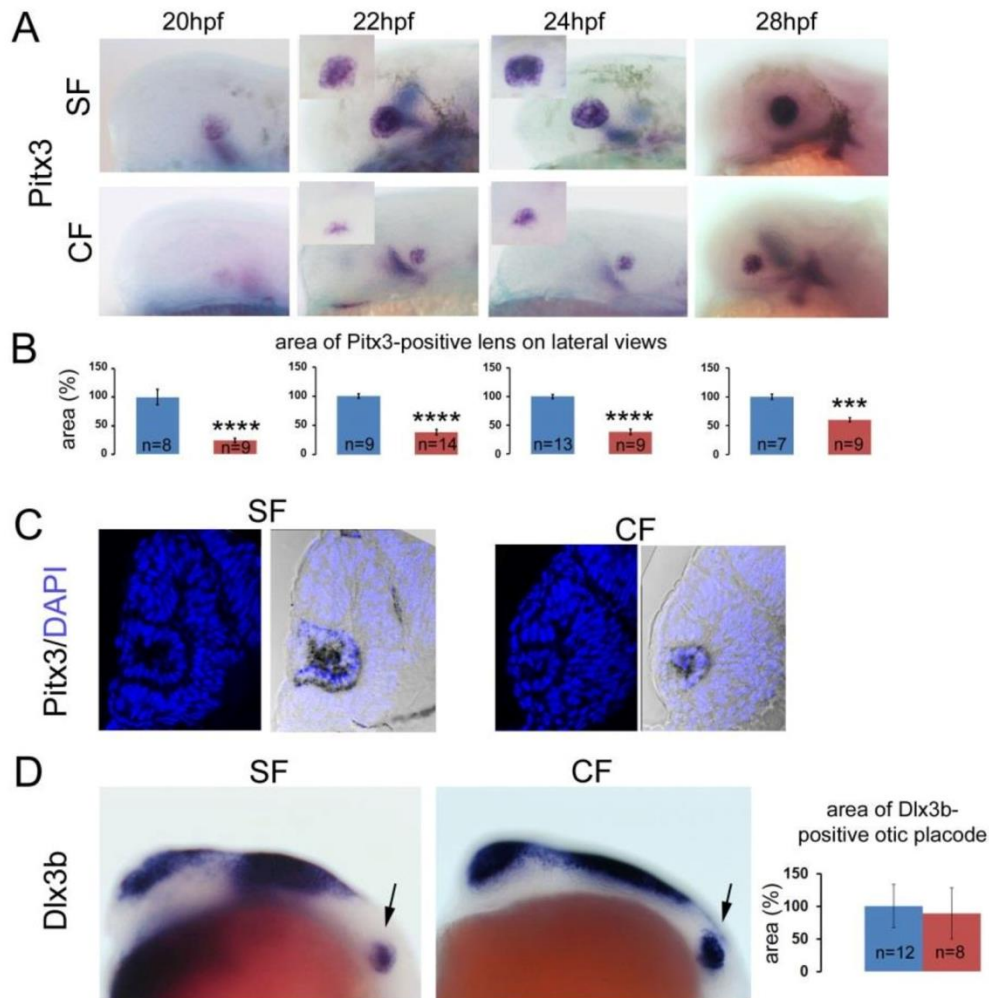
Yamamoto, Y. and Jeffery, W. R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science* **289**, 631-3.

Yamamoto, Y., Stock, D. W. and Jeffery, W. R. (2004). Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* **431**, 844-7.

Yoshizawa, M., Goricki, S., Soares, D. and Jeffery, W. R. (2011). Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Curr Biol* **20**, 1631-6.

Zhou, X. and Vize, P. D. (2004). Proximo-distal specialization of epithelial transport processes within the *Xenopus* pronephric kidney tubules. *Dev Biol* **271**, 322-38.

Supplemental material.



Suppl. Figure 1

Suppl. Figure 1: additional data on comparative patterning of the placodes.

A, Time course of Pitx3 expression in the lens between 20hpf and 28hpf in SF (top) and CF (low) embryos, on lateral views. The insets correspond to photographs taken in dorsal view.

B, Corresponding quantification of lens size (measured on lateral views) between 20hpf and 28hpf in SF (blue) and CF (red). Data are mean±s.e.m. Significant differences are indicated: ***p<0.001; ****p<0.0001, Mann Whitney tests.

C, Sections through the eyes after Pitx3 in situ hybridization at 22 hpf with DAPI counterstain. The left photographs show DAPI fluorescence images, and the right pictures show merged DAPI and Normarski bright field images.

D, At 16hpf, Dlx3b also labels the otic placodes (arrows), seen here on lateral views. Measurements of the size of the Dlx3b-positive otic placodes in CF and SF show no significant size difference (NS, Mann Whitney test). Data are mean±s.e.m.

III. Discussion

Nous avons pu montrer que le cristallin est correctement spécifié chez les CF : il exprime correctement Pax6 au stade panplacodal, puis Pitx3. Nous savons aussi qu'il exprime correctement Prox1 (Jeffery et al., 2000). En revanche, il est plus petit chez les CF à tous les stades de son développement. Au contraire, la placode olfactive est étendue dès le stade du champ panplacodal, et cette modification perdure jusqu'au stade où des neurones différenciés apparaissent dans l'épithélium olfactif. Il pourrait donc s'agir d'une réallocation de cellules au sein du champ panplacodal, du territoire présomptif du cristallin vers celui de l'épithélium olfactif.

Cette modification de la régionalisation du champ panplacodal pourrait être due à des modifications de signalisation. Outre l'hétérotopie de Shh et l'hétérochronie de Fgf8 (Pottin et al., 2011; Yamamoto et al., 2004), nous mettons ici en évidence une hétérotopie de Bmp4. Son effet sur la régionalisation de la plaque neurale et des placodes est difficile à tester, puisque nous ne savons pas si cette modification du territoire d'expression correspond à une augmentation ou une diminution de la signalisation Bmp. Traiter des embryons avec un inhibiteur de cette signalisation comme la dorsomorphine ne permettrait donc pas *a priori* de copier le phénotype d'une des deux populations. Nous envisageons d'utiliser des billes imprégnées d'un inhibiteur et de les implanter à proximité du polster chez des SF, même si l'utilisation de billes chez des embryons de poissons est peu documentée (Hyatt et al., 1996).

En revanche, pour Shh et Fgf8, il est clair que les embryons CF ont un signal plus fort. Pour comprendre l'impact de ces différences de signalisation sur le champ panplacodal, nous avons donc traité des embryons avec des inhibiteurs des différentes signalisations, pendant la période correspondant à la régionalisation du champ panplacodal (à la fin de la gastrulation, de 6 à 10hpf). Comme attendu, l'augmentation de la signalisation Shh doit participer à la réduction de taille du cristallin chez le CF, puisqu'un traitement à la cyclopamine chez l'embryon permet d'augmenter la taille du cristallin. Précédemment, un traitement à la cyclopamine de CF Pachón (dans des conditions non décrites) a permis d'augmenter la taille du cristallin (30% plus large), mais sans « sauver » l'œil du CF (Yamamoto et al., 2004). L'augmentation de l'expression de Shh chez le CF n'est donc pas la seule modification qui conduit à l'apoptose, mais elle participe bien à la modification de la taille du cristallin, en jouant sur la régionalisation du champ panplacodal. En effet, parallèlement à l'effet sur le cristallin, des résultats préliminaires montrent que la cyclopamine tend à réduire la taille de la placode olfactive. Il est donc possible que, au sein du champ panplacodal, les cellules qui donnent normalement de l'épithélium olfactif chez les CF, soient sous l'effet de la cyclopamine re-spécifiées en futures cellules du cristallin (Fig 77).

Le traitement à la cyclopamine effectué ici doit probablement affecter aussi la régionalisation des crêtes neurales. Or certaines cellules des crêtes neurales participent à la formation de l'épithélium olfactif (Saxena et al., 2013). Mais nous n'avons pas étudié l'effet du traitement sur la composante « crête neurale », puisque l'hybridation *in situ* *Eya2* marque seulement la composante placodale.

Concernant la signalisation Fgf, nos données préliminaires suggèrent un rôle promouvant à la fois le développement du cristallin et la destinée olfactive. L'effet de l'inhibition de Fgf sur la taille du cristallin semble le même que celui mis en évidence chez l'*Astyanax* il y a quelques années (Pottin et al., 2011). Le traitement avec l'inhibiteur de FGF était appliqué entre 8 et 12hpf dans cet article (contre 6-10hpf pour le travail présenté ici), et à une concentration de 2µM (contre 0.5µM ici). La concentration plus forte a été initialement testée, mais le développement global des embryons était fortement affecté, probablement parce que la gastrulation ne s'effectuait pas correctement. En revanche, nos résultats préliminaires ne correspondent pas à ce qui a été décrit dans d'autres espèces (Bailey et al., 2006; Nechiporuk et al., 2007, voir introduction, partie B II b), où la signalisation Fgf promeut la destinée olfactive et réprime le destin cristallin. Il faut noter que si la signalisation Fgf est connue pour réprimer le destin cristallin au sein du champ panplacodal, elle promeut ensuite l'expression de gènes de différenciation du cristallin comme les facteurs Maf (voir introduction, partie B IV c 2) et plus tôt, elle promeut la formation de la bordure de la plaque neurale (voir introduction, partie B II a). Il est donc possible que la fenêtre de traitement choisie n'influence pas seulement la régionalisation du champ panplacodal mais aussi d'autres événements plus précoces ou plus tardifs.

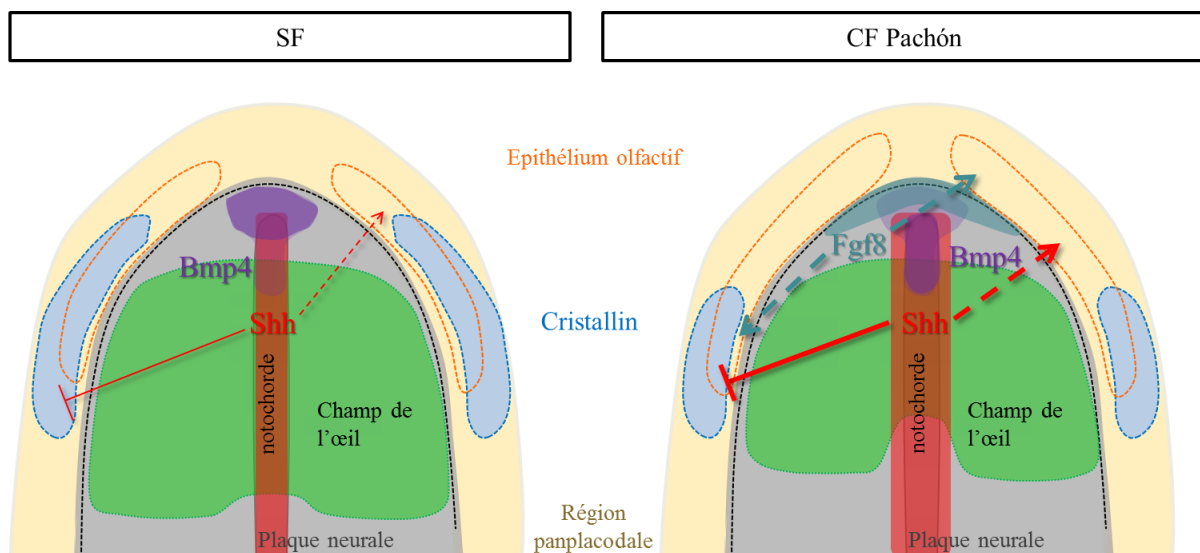


Figure 77 Schéma en vue dorsale de la plaque neurale antérieure et du champ panplacodal à 10hpf chez les *Astyanax* SF et CF. La taille des territoires présomptifs du cristallin (en bleu) et de l'épithélium olfactif (en orange) sont indiqués, ainsi que le rôle des signalisations Shh (en rouge) et Fgf8 (en bleu-vert). Les tirets indiquent des données encore préliminaires.

Nous avons pensé que la petite taille du cristallin CF pouvait être la cause directe de son entrée en apoptose, par un défaut d'effet de communauté. Nous avons donc diminué la taille du cristallin des SF par ablation laser de cellules précurseurs du cristallin à 12 hpf. Le petit cristallin de ces SF n'est pas entré en apoptose, suggérant que la taille réduite n'est pas suffisante pour provoquer l'apoptose. D'autres défauts doivent donc participer à l'entrée en apoptose du cristallin, notamment des défauts de différenciation, qui sont discutés dans l'article 3.

Il est également possible que la morphogenèse ou bien le patron de prolifération du cristallin soient modifiés chez l'*Astyanax* cavernicole. Pour appréhender ces deux aspects, nous avons choisi d'imager des embryons d'*Astyanax* SF et CF, en collaboration avec la plateforme BioEmergences, de la fin de la gastrulation au stade correspondant à l'éclosion, grâce à un marquage des noyaux et des membranes permettant de suivre les cellules au cours du temps. Cette imagerie en 4 dimensions nous a déjà permis de suivre « à rebours » des cellules de cristallin chez des SF et de déterminer leur origine dans l'embryon, en marge de la plaque neurale. Cela nous a également permis de voir que la morphogenèse du cristallin semble s'opérer chez les SF selon le même timing que celui des poissons-zèbres, avec une formation de la placode vers 16 hpf et un début d'invagination entre 18 et 20 hpf (Greiling and Clark, 2009). Nous espérons pouvoir obtenir le même type de résultats chez les CF, pour pouvoir les comparer.

Ce travail a donc permis de montrer que, dès la fin de la gastrulation, les embryons SF et CF sont déjà différents. En particulier, les signalisations précoces qui « modèlent » les embryons semblent modifiées de manière assez générale. Une troisième voie de signalisation, en plus de Shh et Fgf, montre des différences entre SF et CF. La plaque neurale antérieure des CF doit donc être très largement remodelée. En particulier, en ce qui concerne le champ panplacodal, il semble que la placode olfactive soit étendue aux dépens de la placode du cristallin. Or il est possible qu'une placode olfactive plus étendue, puis une narine plus grande permettent une olfaction meilleure des CF. Il a déjà été montré dans la grotte Subterraneo que les individus cavernicoles, à larges narines, détectaient mieux la nourriture que les autres *Astyanax* (Bibliowicz, Alié et al., 2013). L'olfaction étant *a priori* beaucoup plus utile dans l'obscurité que la vision, les modifications de taille respective des deux placodes pourraient résulter d'un « trade-off ».

C. Différenciation du cristallin chez *Astyanax mexicanus*

I. Introduction

Au vu des résultats de l'article précédent, sur le développement précoce de la placode du cristallin, il semble que le cristallin des CF est correctement spécifié et que sa petite taille ne soit pas impliquée dans son entrée en apoptose. Nous nous sommes donc demandé si le problème du cristallin CF n'était pas plutôt un défaut de différenciation.

Parmi les gènes très importants pour la différenciation du cristallin figurent les cristallines (voir introduction, partie B IV d). Une cristalline, *cryaa*, est déjà connue pour ne pas être exprimée correctement chez 2 populations d'*Astyanax* CF (Behrens, 1998; Strickler et al., 2007b). Nous avons choisi de nous intéresser aux modifications de séquence et d'expression des cristallines chez l'*Astyanax* CF Pachón. Nous avons recherché les séquences de cristallines dans des données de transcriptome présentées dans l'article 4 (résultats, partie D), et avons comparé les séquences des transcrits SF et CF (en utilisant également des données Illumina de transcriptome obtenues plus récemment dans l'équipe). Pour détecter des différences d'expression, nous avons réalisé des hybridations *in situ* sur des larves de 36 hpf. Nous avons aussi cherché à comprendre l'implication de 2 cristallines « candidates » dans l'apoptose du cristallin.

II. Article soumis à *Developmental Neurobiology*



**Lens defects in *Astyanax mexicanus* cavefish: focus on
crystallin evolution and function**

Journal:	<i>Developmental Neurobiology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Hinaux, Hélène; CNRS, Neurobiologie & Développement Blin, Maryline; CNRS, Neurobiologie & Développement Fumey, Julien; CNRS, Laboratoire Evolution Génomes et Spéciation Legendre, Laurent; CNRS INRA, AMAGEN Casane, Didier; CNRS, Laboratoire Evolution Génomes et Spéciation Rétaux, Sylvie; CNRS, Neurobiologie & Développement
Key Words:	molecular evolution, development, polymorphism, phylogeny, gene expression

SCHOLARONE™
Manuscripts

For submission to Developmental Neurobiology

Lens defects in *Astyanax mexicanus* cavefish: focus on crystallin evolution and function

Running title: Evolution of crystallins in cavefish

Hélène Hinaux¹, Maryline Blin¹, Julien Fumey², Laurent Legendre³, Didier Casane² and Sylvie Rétaux^{1*}

¹ DECA group, N&D laboratory, UPR3294,

² MULTIGEN group, LEGS laboratory, UPR9034,

³ AMAGEN (UMS 3504 CNRS / UMS 1374 INRA),

CNRS avenue de la terrasse, 91198, Gif sur Yvette, France.

5 keywords: molecular evolution, development, polymorphism, phylogeny, gene expression

* Corresponding author: retaux@inaf.cnrs-gif.fr, 00331 69 82 34 52

Acknowledgements

We thank Magalie Bouvet and Stéphane Père for taking care of our *Astyanax* colony and members of the AMAGEN platform for providing us with zebrafish eggs. This work has benefited from the facilities and expertise of the high throughput sequencing platform and the QPCR platform of IMAGIF (Centre de Recherche de Gif - www.imagif.cnrs.fr). We thank Céline Noirot (GenoToul Bioinformatics Platform) for assembling the Illumina data to be published elsewhere. The Pachón cavefish genome project team and particularly Wes Warren and Suzanne McGough are acknowledged for the release of the preliminary assembly (the assembly work was supported by National Institutes of Health, NIH grant R24 RR032658-01 to Dr. Wesley Warren, Washington University School of Medicine). HH was supported by Retina France. Our work is supported by Agence Nationale pour la Recherche ANR grants [ASTYCO] to SR and [BLINDTEST] to SR and DC, and by an IDEEV grant to SR and DC. The authors declare no conflict of interest.

John Wiley & Sons, Inc.

ABSTRACT

The fish *Astyanax mexicanus* presents, within the same species, populations of river-dwelling surface fish and blind cave-living fish. In cavefish, the eyes develop almost normally during embryogenesis. But 40 hours after fertilization, the lens enters apoptosis, triggering the progressive degeneration of the entire eye. Before apoptosis, the cavefish lens expresses early differentiation factors correctly. Here we searched for possible late differentiation defects that would be causal in cavefish lens degeneration. We reasoned that crystallins, the major lens structural proteins, could be defective or mis-regulated. We surveyed the cavefish and surface fish transcriptomes and uncovered 14 *Astyanax* crystallins from the beta, gamma, lambda, mu and zeta families. These proteins are less polymorphic and accumulate more mutations in cavefish than in surface fish, suggesting relaxed selection at these loci in cavefish. *In situ* hybridizations and qPCR show that *crybb1c*, *crybgx*, *crygm5* and *crygmx* are expressed at much lower levels or are not expressed in the cavefish lens. For the two best crystallin candidates, we tested a potential causal role in cavefish lens apoptosis. *Crybgx*, not expressed in CF from very early on, failed to induce any defect when knocked-down in zebrafish embryos. The anti-apoptotic *cryaa*, previously shown to be faintly expressed in CF, failed to rescue the lens when re-expressed by transgenesis in cavefish. Thus, whereas cavefish crystallins are generally affected in sequence and expression, their individual manipulation has little effect on the lens. We propose that a combinatorial effect of all the crystallins defects may be responsible for triggering lens apoptosis.

INTRODUCTION

Astyanax mexicanus is a species of teleost fishes living in Mexico and comprising two types of populations or morphs: populations of eyed river-dwelling fishes (surface fish, SF) and 29 populations of blind cavefishes (CF) living in total and permanent darkness (Jeffery, 2008). This makes this fish an outstanding model species for micro-evolutionary studies. In particular, the mechanisms underlying the developmental regression of the eyes in cavefish have puzzled researchers for several decades (Jeffery, 2009).

The most studied cavefish population lives in the Pachón cave, and is the population studied in this article. In this fish, eyes first develop during embryogenesis, but they soon degenerate progressively during larval stages, so that only a cyst covered by skin remains in the fully eyeless and blind adult. The first eye structure that degenerates is the lens. It does so by undergoing massive apoptosis, starting at 40 hours post fertilization (hpf, i.e., after hatching), and cell death subsequently spreads to the entire neural retina (Alunni et al., 2007). Importantly, the lens is responsible for the degeneration of the entire eye, as the transplantation of a CF apoptotic lens into a SF optic cup is sufficient to induce degeneration of the SF eye. Conversely, the transplantation of a SF lens into a cavefish eye is sufficient to partially restore the cavefish eye. As these transplantation experiments were performed at 24 hpf, the authors concluded that cavefish lens apoptosis is a process autonomous to the lens (Yamamoto and Jeffery, 2000). Of note at 24 hpf in both SF and CF *Astyanax*, invagination of the lens mass is already completed and the first differentiation-driving transcription factors such as *Prox1* are expressed (Jeffery et al., 2000).

Vertebrate lenses are made of two cell types: fiber cells and epithelial cells. A lens epithelium forms correctly in CF, and continues to proliferate even after the onset of apoptosis (Alunni et al., 2007; Strickler et al., 2007 b). Thus defects in the cavefish lens could involve fiber cell differentiation deficiencies. The differentiation of these cells mostly involves the accumulation of particular proteins, denominated crystallins, at high concentrations in the central fiber cells of the lens (Fagerholm et al., 1981). These proteins maintain the refractive properties and optical clarity of the lens through their structural and chaperone-like roles. They belong to 3 major (and large) families: α , β and γ . The classification of a protein as “crystallin” is arbitrary and does not have a phylogenetic basis: α -crystallins are related to small heat shock proteins (de Jong et al., 1993), whereas β and γ crystallins belong to the same superfamily as *aim* genes (absent in melanoma) (Wistow et al., 2005). In mammals,

there are 14 crystallins (2 alphas, 7 betas, and 8 gammas). In zebrafish, there are 3 alpha, 13 beta and at least 37 gamma crystallins (Greiling et al., 2009). Besides, there are specific expansions of some crystallin subfamilies in fish, which therefore have no ortholog in mammals (Greiling and Clark, 2012). Functionally, α -crystallins act as chaperones, and their expression increases with age in several species including zebrafish (Greiling et al., 2009). The α A-crystallin *cryaa* in particular has an anti-apoptotic role in cell culture (Andley, 2000). In human, its loss or some mutations can lead to cataract (Litt, 1998; Mackay et al., 2003), and in zebrafish, the *cloche* mutant which has reduced levels of *cryaa* develops cataract very early (Goishi, 2006). However, *cryaa* knockdown by morpholino injection does not have a detectable effect in zebrafish (Posner et al., 2013). Crystallins from other families are less well-known, in particular in fish, except for some expression data in zebrafish (Chen et al., 2001; Goishi, 2006; Wang et al., 2008). In short, the function of crystallins in fish lens development is poorly studied and understood.

More than 15 years ago, the expression of the anti-apoptotic *cryaa* was found to be lost in *Astyanax* Piedras cavefish (Behrens, 1998), opening novel directions in the understanding of cavefish eye degeneration. Since then, it was also shown that *cryaa* expression is only very transient in Pachón cavefish lens (Strickler et al., 2007 a). *Cryaa* is expressed from 36 hpf at low levels in *Astyanax* lens, and there is a clear difference of expression between SF and CF from 48 hpf onwards. We reasoned that other crystallins could be defective or misexpressed in cavefish, thus affecting lens differentiation and causing apoptosis. We decided to survey the *Astyanax* developmental transcriptome we recently generated (Hinaux et al., 2013) for crystallin sequences and to screen their expression in cavefish during the “critical” developmental period. Out of the 14 *Astyanax* crystallins we identified, 3 carried radical mutations and 4 showed expression differences between SF and CF. For two of them that we considered as best candidates (*crybgx*, not expressed in CF from very early on, and *cryaa*, with anti-apoptotic role) we further tested a potential causal role in cavefish lens apoptosis either by morpholino knockdown or by expression rescue by transgenesis. The results show that manipulating these two crystallin candidates has little effect on lens development, suggesting that a combinatorial effect of all the crystallins defects in the lens may be responsible for triggering apoptosis, or that other defects are yet to be found to explain cavefish lens apoptosis.

MATERIAL AND METHODS

Fish samples

Laboratory stocks of *A. mexicanus* surface fish and Pachón cave fish were obtained in 2004 from the Jeffery laboratory at the University of Maryland, College Park, MD. They had been both lab-raised for some generations, and surface fish had initially been collected in San Solomon Spring, Balmorhea State Park, Texas. In our facility, they were maintained and bred at 23°C (Pachón) and 26°C (surface) on a 12:12 hours light/dark cycle in tap water. Embryos were collected after natural spawning, staged according to the developmental staging table (Hinaux et al., 2011) and fixed at various stages in 4% paraformaldehyde (PFA). After progressive dehydration in methanol, they were stored at -20°C.

Danio rerio AB zebrafish strain originating from the ZIRC (University of Oregon, USA) were bred in UMS AMAGEN facilities. They were maintained and grown at 28°C with 14 hours light per day. Embryos were obtained by pair mating for maximum efficiency for injection's goal.

Animals are treated according to the French and European regulations for handling of animals in research. SR's authorization for use of animals in research is number 91-116, and Paris Centre-Sud Ethic Committee authorization number is 2012-0052.

Phylogeny

All zebrafish crystallin protein sequences were retrieved from Ensembl database and BLASTed against the *Astyanax* developmental transcriptome contig sequences (available at <http://genotoul-contigbrowser.toulouse.inra.fr:9099/index.html>, (Hinaux et al., 2013)). The putative *Astyanax* crystallin protein contigs were then aligned with Vertebrate crystallin proteins, retrieved from Ensembl by Perl API "one2one homolog" tool, using zebrafish gene IDs as queries. Evolutionary analyses were conducted with MEGA5 (Tamura et al., 2011), using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method (Zuckerlandl and Pauling, 1965) and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All ambiguous positions were removed for each sequence pair.

Sequence comparisons

The developmental transcriptome of *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachón cavefish from our animal facility, as well as the transcriptome of the closely-related Characiform *Hyphessobrycon anisitsi* (Javonillo et al., 2010), were sequenced on Illumina HiSeq at the Imagif high throughput sequencing platform. Transcriptome reads were assembled at the Genotoul bioinformatics platform in Toulouse. The complete dataset will be published elsewhere (Fumey et al., in prep).

The fourteen *Astyanax* crystallin sequences uncovered by the phylogenetic analysis were BLASTed against the Illumina assembly. Eleven crystallins were retrieved and a SNP analysis was performed on these sequences (*crybgx*, *crygm5* and *crygmx* were missing: mapping of the reads against the Sanger contig revealed that there were almost no CF read for these crystallins, preventing any SNP analysis). First, variations in *Astyanax* sequences were detected using GATK (McKenna et al., 2010; DePristo et al., 2011). Then, a homemade program allowed to filter these variations: SNPs were defined as positions with at least 2 reads per allele and at least 4 reads per population (similar thresholds as in (Hinaux et al., 2013)). SNPs were then classified as: (1) shared when the position was polymorphic in both SF and CF; (2) polymorphic in only one morph, the position being fixed in the other morph; or (3) fixed in both morphs.

The direction of the various changes was inferred using *Hyphessobrycon anisitsi* as an outgroup: alleles were defined as ancestral when they were identical to the outgroup allele, and as derived otherwise.

Whole-mount *in situ* hybridization

cDNAs were amplified by PCR from pCMV-Sport6 plasmids picked from our cDNA library using SP6 and T7 primers, and digoxigenin- riboprobes were synthesised from PCR templates. A protocol for automated whole-mount *in situ* hybridization (Intavis) was performed. Briefly, embryos were progressively re-hydrated, permeabilized by proteinase K (Sigma) treatment before being incubated over night at 68° in hybridization buffer containing the appropriate crystallin probe. After stringent washes, the hybridized probes were detected by immunohistochemistry using an alkaline phosphatase-conjugated antibody against digoxigenin (Roche) and a NBT/BCIP chromogenic substrate (Roche).

After staining, embryos were photographed *in toto*, always in the same orientation, under a Nikon AZ100 stereomicroscope using agarose wells.

Quantitative PCR

Total RNA was extracted from 36hpf cavefish or surface fish embryos with TRIzol reagent (Invitrogen) followed by purification and DNase treatment with the Macherey Nagel NucleoSpin® RNAII kit. RNA amounts were determined by the Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific). 1µg of total RNA was reverse-transcribed in a 20 µl final reaction volume using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) with RNase inhibitor and random primers following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed on a QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System with a SYBR green detection protocol. 3 ng of cDNA were mixed with Fast SYBR® Green Master Mix and 500 nM of each primer in a final volume of 10µL. The reaction mixture was submitted to 40 cycles of PCR (95°C/20 sec; [95°C/1 sec; 60°C/20 sec] X40) followed by a fusion cycle in order to analyze the melting curve of the PCR products. Negative controls without the reverse transcriptase were introduced to verify the absence of genomic DNA contaminants. Primers were designed by using the Primer-Blast tool from NCBI and the Primer Express 3.0 software (Life Technologies). Primers were defined either in one exon and one exon-exon junction or in two exons span by a large intron. The primers used are as followed:

AMcrybgx-Fw	5' CTGTGCTCCAACGTGCCTTT 3'
AMcrybgx-Rv	5' GCACGGAGTTGCATCTTTCAG 3'
AMcrybb1c-Fw	5' CGATTGCTTCATGTCCGTCA 3'
AMcrybb1c-Rv	5' CACAGGCTGGGGATGTCTTC 3'
AMcrybb1a-Fw	5' GGAGACCCCTTCATGGGAAA 3'
AMcrybb1a-Rv	5' ACCACGGTCACACACGTTCA 3'
AMgapdh-Fw	5' GTTGGCATCAACGGATTTGG 3'
AMgapdh-Rv	5' CCAGGTCAATGAAGGGGTCA 3'

Specificity and the absence of multi-locus matching at the primer site were verified by BLAST analysis. The amplification efficiencies of primers were generated using the slopes of standard curves obtained by a four-fold dilution series. Amplification specificity for each real-time PCR reaction was confirmed by analysis of the dissociation curves. Determined Ct values were then exploited for further analysis, with the Gapdh gene as reference. Each sample measurement was made at least in duplicate.

Morpholino injection

A morpholino targeting *Danio rerio crybgx* mRNA was designed and ordered at GeneTools: it targets the splice site at the junction of exon 4 and intron 4 (5' ACTATAACTGTGTGTCTGACCTGTT 3').

This morpholino was injected at the one-cell stage in zebrafish AB strain eggs at 500µM. Zebrafish larvae were then raised at 28 °C for 3 or 4 days, and fixed in PFA 4% for TUNEL assay (Promega), or immersed in Trizol for RNA extraction. The form of *crybgx* mRNA was assessed with PCR on cDNA, using the following primers amplifying exons 1 to 5: Fw 5' AGTCCCCGGACTAGCCCAAC 3' and Rv 5' GGTGGGAATGTCATCATGAAGC 3'.

Transgenesis

A fish transgenesis vector pDEST_AMA12Hkaede from the AMAGEN transgenesis platform, with a CFP reporter gene under the control of zebrafish *crybbl1a* promoter, was modified in order to allow the expression of *Astyanax* SF *cryaa* under the control of zebrafish *crybbl1a* promoter. The vector was co-injected with IScel meganuclease mRNA or Tol2 transposase at the one-cell stage in *Astyanax* CF embryos. F0 embryos were screened at 60 hpf for lens fluorescence. Positive embryos were raised until adulthood.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of *Astyanax* crystallins and phylogeny

We took advantage of *Astyanax* developmental transcriptome data we obtained recently (Hinaux et al., 2013) and which corresponds to transcripts expressed between 6hpf and two weeks of development, to search for crystallin ESTs in our model species. We BLASTed protein sequences of all zebrafish crystallins to retrieve all crystallin contigs present in our transcriptome assembly. We then aligned them for phylogenetic analysis with several teleostean as well as some tetrapod vertebrate crystallin proteins. Below we report the identification of 14 *Astyanax* crystallins: 6 β -crystallins, 3 γ -crystallins as well as a large number of γ M2d crystallins, two $\beta\gamma$ crystallins, one λ -crystallin, one μ -crystallin and one ζ -crystallin.

The crystallin phylogenetic trees shown were built using the Neighbor Joining method. Identical results concerning the orthology of the various *Astyanax* sequences were obtained when using Maximum Likelihood method (data not shown).

In the beta family, our phylogenetic tree confirms the existence of two major subgroups: β A and β B (**Fig1A**). *Astyanax* transcripts of the β family clearly correspond to 6 different genes: *crybb1a*, *crybb1c*, *crybb1d*, *cryba2*, *cryba1l* and *cryba1b*. This crystallin group is therefore well represented during *Astyanax* embryonic and larval lens development.

The γ family is also subdivided into different subgroups (**Fig1B**). On one hand, crystallins of the γ A to γ F subfamilies do not have orthologs in fish including *Astyanax*. On the other hand, crystallins of the γ M subfamily (which appear as paraphyletic on the tree) are “fish-specific” (Wistow et al., 2005). In this group, we identified two *Astyanax* sequences: *crygm5* and *crygmxb*. Finally, γ N and γ S crystallins are present in all vertebrates, and one *Astyanax* member, *crygn2*, was retrieved from the developmental transcriptome.

Besides, we found a particularly high number ($n = 47$) of crystallin contigs belonging to the γ M2d subfamily (**FigS1A**). It is not clear whether this results from an expansion of this subfamily (independent from the one in zebrafish, for example see *crygm2d* expansion in

zebrafish on Fig1B) or whether these contigs correspond to alternative splice variants of only a few genes. The sequences of these contigs were BLASTed against the preliminary Pachón cavefish genome assembly, and several hits were retrieved on 6 different scaffolds (KB882270.1, KB882254.1, KB882235.1, KB882151.1, KB882173.1 and KB882147.1). On one of them (KB882151.1), there are many hits between 2.73Mb and 2.84Mb (mostly unannotated in the current Ensembl version – release 74) that could correspond to tandem duplications. Only 4 crystallin genes are annotated in this region, ENSAMXG00000009606, ENSAMXG00000009646, ENSAMXG00000009725 and ENSAMXG00000009713, and would correspond to some of these paralogs.

Anyway, it is interesting to note that the expression of a *crygm2d* crystallin has already been studied in *Astyanax* (Jeffery et al., 2000) (under the name « γ M-crystallin») and revealed no differences between SF and CF.

Two crystallins of the $\beta\gamma$ family, usually grouped with the gamma family, are present in the developmental transcriptome: *crybgx* and *crybg3* (Fig1B and FigS2). *Crybg3* is not shown on the γ family tree (Fig1B), as it does not align correctly with other γ crystallins. The phylogenetic analysis for this subfamily was performed by alignment with *aim* (absent in melanoma) genes, to which they seem to be more related (FigS2).

No tree is shown for the α -crystallin family, as there is no α -crystallin transcript in our dataset. This is not so surprising, as our developmental transcriptome contained samples of young embryos and larvae (up to 2 weeks old), and in zebrafish, α crystallin content is low in young larvae and increases with age (Greiling et al., 2009).

Finally, some other crystallins are present in our transcriptome data: a λ -crystallin *cryl1*, a μ -crystallin *crym* and a ζ -crystallin *cryz11* (FigS2). In Suppl Table 1 (columns 1-2-3), the correspondence between our developmental transcriptome contig name, the “phylogenetic” name and the Ensembl code of the recent genome assembly is given. In sum, we have identified 14 crystallins of various groups, plus 47 γ M2d crystallins, that are expressed during development in *Astyanax*, at the time when the eye first develops and then starts degenerating. These crystallins are therefore potential candidates for the developmental defects that occur in the *Astyanax* cavefish lens.

Sequence comparison between *Astyanax* surface fish (SF) and cavefish (CF) crystallins

Our developmental transcriptome was generated from hundreds of individuals born in our fish facility, therefore giving us access to the genetic diversity present in SF and CF populations (Hinaux et al., 2013). We compared SF and CF coding sequences for 11 of the 14 crystallins uncovered in *Astyanax*, looking for polymorphisms and for possible CF mutations. Of note, *crygm2d* crystallins were not analyzed as we couldn't assign the various transcripts to genes; and data on CF sequences for *crybgx*, *crygm5* and *crygmx* was missing. Among the 11 sequences analyzed, we found 16 variable positions which did not affect the protein sequence (= synonymous changes), and 13 variable positions which affected the protein sequence (= non-synonymous) (**Fig 2, Table 1**). To infer the direction of the changes, we compared the alleles found in the 2 *Astyanax* morphs with those found at the same position in an outgroup, *Hyphessobrycon anisitsi*, a closely-related Characiform for which we also sequenced the developmental transcriptome (see Methods). Among the non-synonymous changes,

- One is a variable position in both SF and CF (= a shared polymorphism) in *cryb1a*.
- Eight positions in *cryball*, *crybg3*, *crym* and *cryz11* are polymorphic in SF only. Among them, a polymorphic allele found for SF *cryball* results in an amino acid with different physico-chemical properties, and can thus be considered as a radical mutation. For these 8 positions, the CF allele is the same as the allele in the outgroup *Hyphessobrycon anisitsi*, and therefore probably corresponds to the ancestral allele.
- No position is polymorphic in CF only, which is reminiscent of what was found transcriptome-wide at larger scale in our previous study (Hinaux et al., 2013): CF are globally less polymorphic than SF, probably because of their small population size. This "rule" applies without exception to the crystallins.
- Finally 4 positions (in *crybalb*, *cryb1a* and *crybg3*) correspond to fixed mutations in CF. Two of these mutations (in *cryb1a* and *crybg3*) can be considered radical. We did not find insertions/deletions in CF sequences. There is apparently no fixed mutation in SF.

In sum, SF have thus zero fixed non-synonymous mutation for 9 polymorphic positions, whereas CF have fixed 4 non-synonymous mutations for only 1 polymorphic position (**Fig2**, Fisher test, $p=0.0049$, **). We conclude that CF crystallins seem to accumulate more non-synonymous mutations than what would be expected given their polymorphism level (Table 1, column 4). Moreover, the surprisingly low number of fixed changes detected in CF crystallins (only 4) makes it impossible to calculate a Ka/Ks ratio, but suggests relaxed purifying selection.

In situ hybridization screen for crystallin expression in SF and CF lens

Then, we examined expression patterns and levels of the crystallins identified above during early larval SF and CF development. Our transcriptome study, based on Sanger sequencing, was not intended to analyze expression differences between SF and CF. However, for some crystallins, the difference in the number of SF and CF reads was so striking that it gave a clue about expression differences (Table 1, columns 5-6). We therefore focused our expression analysis on these 8 crystallins (*cryba2*, *crybb1a*, *crybb1c*, *crybb1d*, *crybgx*, *crygm5*, *crygmbx*, *crygn2*, bolded in Table1). Moreover, *cryaa*, previously reported to be expressed very transiently during a few hours around 30hpf in CF (Strickler et al., 2007 a), was cloned to be used as a control for *in situ* hybridization. The crystallin expression screen was performed at 36 hpf, a stage slightly before the onset of lens apoptosis in CF (Alunni et al., 2007). A study has suggested that lens apoptosis might even start earlier, at 24 hpf (i.e., when larvae hatch). However, it appears that most apoptotic cells at this stage reside in the surface ectoderm (presumptive cornea) and not in the lens. Besides, there are also some apoptotic cells in the surface ectoderm of SF at this stage (Jeffery and Martasian, 1998). In fact, in zebrafish, apoptosis also occurs in the surface ectoderm and could be involved in the reorganization of the lens epithelium in a single cell layer (Greiling et al., 2010). The earliest time point for which specific apoptosis inside the CF lens is certain is thus 40 hpf.

At this relevant and critical stage of lens development, we found that:

- (1) *cryaa* was lowly expressed in SF but not CF lens at 36 hpf (**Fig3AB**). That is not in total agreement with Strickler's study (Strickler et al., 2007 a), where *cryaa* was found to be expressed faintly in both SF and CF at 36hpf, and not expressed anymore in CF at 48 hpf. This discrepancy can be due to the fact that embryos in this study were raised at 25 °C instead of 23 °C, which makes developmental stages difficult to compare (Hinaux et al., 2011). In any case, *cryaa* is not correctly expressed in CF at a critical stage of CF lens development.
- (2) *crybb1a*, *crybb1d*, *cryba2* and *crygn2* were strongly expressed in both SF and CF lenses at 36 hpf (**Fig3CD,EF,GH,IJ**). Of note, the smaller expression spot in CF eyes is only due to the small size of the lens but not to an expression defect. Of note, Strickler et al. (Strickler et al., 2007 a) found the same result for the crystallin *crybb1d*, which they

named *crybb1* in their paper. These crystallins are therefore probably not good candidates to explain the lens defect in CF.

- (3) *crygm5* and *crygmx* were not expressed, neither in SF nor in CF lens at 36 hpf (Fig3KL,MN). We therefore searched for onset of expression of these two crystallins. One day later at 60 hpf, *crygm5* and *crygmx* were strongly expressed in SF but not in CF (Fig4AB, CD). This difference is very significant, yet it probably occurs too late to participate in the trigger of CF lens apoptosis, which starts at 40 hpf.
- (4) *crybb1c* and *crybgx* were strongly expressed in SF but not in CF lens at 36 hpf (or at extremely low level for *crybb1c*) (Fig3OP,QR). In SF, these two crystallins are expressed in lens fibers cells but not in the lens epithelium (Fig3O,Q, insets). Very little is known about these two crystallins in other species. In zebrafish, *crybb1c* is one of the most abundantly expressed crystallins throughout development and from 4.5 dpf (days post fertilization) onwards, and *crybgx* is expressed at low levels, starting around 4.5 dpf (Greiling et al., 2009).

Characterization of *crybb1c* and *crybgx* expression defects in the CF lens

As expression levels cannot be rigorously quantitatively assessed by *in situ* hybridization, we next performed RT-qPCR on RNA extracts of whole SF and CF 36hpf larvae to confirm the absence/reduction of *crybb1c* and *crybgx* expression in CF. *Gapdh* was used as reference and *crybb1a*, which gave strong ISH signals in both morphs, served as a crystallin “control”. *Crybb1a* expression was indeed easily detectable by qPCR, but was reduced by about 5 times in CF (Fig5). We suggest that this reduction is solely due to the smaller size of the lens in CF: a 5-fold reduction in the volume of the lens would correspond to a 1.7-fold reduction of the radius, which fits with lens diameter measurements performed on *crybb1a* ISH at 36 hpf (SF: $42.6 \mu\text{m} \pm 1.3$ (n = 12); CF: $24.9 \mu\text{m} \pm 2.1$ (n = 9), which corresponds to a 1.71 ratio). Conversely, *crybgx* was hardly detectable by qPCR in CF, meaning that its expression is reduced by at least 60-fold compared to SF. This confirms that *crybgx* expression is lost in CF lens at 36 hpf. Finally, *crybb1c* expression was detected at very weak levels in CF, with an estimated 12-fold reduction compared to SF. This confirms that *crybb1c* regulation is strongly affected at 36 hpf in CF.

A complete developmental time-course of expression was then performed for *crybb1c* and *crybgx*, in order to assess the onset of differential expression between SF and CF, and in order

to discern between the possibilities of an expression heterochrony or a true loss of expression. Neither of the two crystallins was expressed at 24 hpf (data not shown).

Crybb1c expression started in both morphs at 28 hpf, although *in situ* hybridization signals were very low compared to SF (**Fig6AB**). While its expression was almost lost at 36 hpf in CF (**Fig3P**), it was again expressed at low levels at 60 hpf (**Fig6F**). This suggests that the difference in *crybb1c* expression observed at 36 hpf is transient. For discussion purpose, it is interesting to note that *crybb1c* (but not the other beta crystallins *crybb1a* and *crybb1d*) is subject to dysregulation in CF. This is despite the fact that the expressions of these crystallins, very close phylogenetically, are probably under the control of the same transcription factors, such as Maf and Pitx3 (Ishibashi and Yasuda, 2001; Hooker et al., 2012; Templeton et al., 2013). Thus it seems likely that *crybb1c* expression modification in CF is due to alterations in the regulatory sequences of *crybb1c*, but not to upstream factors.

Concerning *crybgx*, expression was detected in SF but not in CF at 28 hpf and 32 hpf, and continued absence of expression was further observed in CF at 60 hpf (**Fig6G-L**). The absence of *crybgx* expression in CF is not due to a gene loss, as it is present as ENSAMXG00000006190 in the Pachón cavefish genome assembly (**Table1**). Thus, *crybgx* is a novel and good candidate for having a role in CF lens defect.

Crybgx loss of function analysis

Crybgx expression is absent in CF from very early on (even earlier than *cryaa*). This makes this crystallin an interesting candidate to be involved in the lens apoptosis phenotype of CF. Besides, to our knowledge, there is a complete lack of data about *crybgx* functional role in any species. We thus decided to perform morpholino knock-down of *crybgx* expression in zebrafish (**Fig7**). *Danio rerio* is indeed relatively close to *Astyanax mexicanus* phylogenetically and is for now more amenable to functional studies than *Astyanax*. The morpholino used targets the splice site at the junction of exon 4 and intron 4 of zebrafish *crybgx* mRNA. It resulted in the appearance of a longer mRNA form at 2 and 2.5 dpf (**Fig7D**), leading to a frame shift and a premature stop codon. We investigated the effect of *crybgx* knock-down on lens apoptosis 3 and 4 days after injection, using TUNEL labeling (**Fig7A-B**). There was no effect of morpholino injection at these two stages (**Fig7C**), showing that loss of *crybgx* expression alone is not sufficient to trigger apoptosis in the zebrafish lens. The absence of *crybgx* in zebrafish morphants is probably compensated by the expression of

other crystallins. In cavefish however, *crybgx* is not the only crystallin which is not expressed correctly, and this accumulation of defects might be causal in lens apoptosis. In particular, *cryaa*, a small chaperone anti-apoptotic crystallin, is also absent in the CF lens.

Cryaa transgenic lens rescue assay

Indeed, the expression of α A-crystallin (*cryaa*) is highly reduced in CF ((Behrens, 1998; Strickler et al., 2007 a) and present data **Fig3AB**). Besides, this crystallin has an anti-apoptotic role in cell culture (Andley, 2000). QTL studies in *Astyanax* also suggest that *cryaa* gene is close to a QTL for eye size (Gross et al., 2008). We therefore designed a transgenic strategy to restore *cryaa* expression in *Astyanax* CF lens, aiming to assess whether the re-expression of this single anti-apoptotic protein in the CF lens was sufficient to prevent apoptosis. The transgene included *Astyanax cryaa* coding sequence under the control of zebrafish *crybb1a* promoter (as well as a CFP reporter gene under the control of the same zebrafish *crybb1a* promoter)(**Fig. 8A**). *Crybb1a* is correctly expressed in *Astyanax* CF (**Fig3**), so *crybb1a* promoter should be active in *Astyanax* CF lens. Indeed, after injection of the transgene in CF eggs, CFP reporter fluorescence was observed in the lens of 2.5 dpf larvae (**Fig8B**), suggesting that the *crybb1a* promoter is indeed driving transgene expression. In these positive F0 larvae, in which the expression of *cryaa* in lens cells is mosaic, the expression of the CFP reporter was progressively lost after a week of development, and there was no rescue of the eye phenotype (**Fig8C**), even in those that showed strong expression in a large portion of the lens at 2.5 dpf (n = 2 with strong expression, n = 8 with medium expression). This result suggests that transient *cryaa* re-expression in CF lens is not sufficient to compensate for other defects and to prevent apoptosis.

CONCLUSION

In total, 8 out of the 15 crystallins that are identified and studied in this paper are modified in CF in one way or another, expression-wise or sequence-wise. Around the onset of eye degeneration in *Astyanax mexicanus* cavefish, at least 5 crystallins are not expressed correctly in the lens. *Cryaa*, *crybb1c*, and *crybgx* show strongly reduced or no expression at 36 hpf; and *crygm5* and *crygmb* are not expressed at 60 hpf. The CF lens therefore misses 5 of its major differentiation proteins. Moreover, 3 additional crystallins (*crybb1a*, *crybalb*,

1
2
3 *crybg3*) carry amino-acid changing point mutations in CF. Our survey therefore points to a
4 global defect in lens “crystallin biology” in cavefish, which occurs under the form of
5 apparently little but multiple modifications. Interestingly, similar -although less numerous-
6 defects are reported for the crystallins of the naked mole rat, an underground living,
7 microphthalmic and blind rodent. In the genome of this animal, CRYBA4 and CRYBB3
8 present premature stop codons, GRYGS carries a mutation (Kim et al., 2011), and gamma
9 crystallins are not properly expressed in the lens after birth (Nikitina et al., 2004). In parallel
10 to these molecular defects, the naked mole rat lens is not apoptotic, but it is indeed malformed
11 (Nikitina et al., 2004), suggesting that the lens defects are less advanced in the mole rat than
12 in the cavefish. We propose that in CF, a combinatorial effect of all the crystallins defects in
13 the lens may be responsible for triggering apoptosis.
14
15

16
17
18 In line with this idea is our failure to demonstrate any causative effect of the two best
19 candidates, *crybgx* and *cryaa*, when tested independently. Indeed, zebrafish morpholino
20 knockdown experiments show that *crybgx* downregulation alone is not sufficient to trigger
21 lens apoptosis. And *cryaa* re-expression alone in the *Astyanax* CF lens by transgenesis does
22 not rescue the lens either, probably because the anti-apoptotic chaperone is overwhelmed by
23 the multiple crystallin defects in CF. Eye size is indeed known to be a polygenic trait
24 (Wilkens, 1988). On the other hand, we cannot exclude that an independent and as yet
25 undiscovered defect in the lens triggers its apoptosis.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

- Alunni A, Menuet A, Candal E, Pénigault J-B, Jeffery WR, Rétaux S. 2007. Developmental mechanisms for retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *J Comp Neurol* 505:221–233.
- Andley UP. 2000. Differential Protective Activity of alpha A- and alpha B-crystallin in Lens Epithelial Cells. *J Biol Chem* 275:36823–36831.
- Behrens M. 1998. Cloning of the α A-crystallin genes of a blind cave form and the epigeal form of *Astyanax fasciatus*: a comparative analysis of structure, expression and evolutionary conservation. *Gene* 216:319–326.
- Chen J-Y, Chang B-E, Chen Y-H, Lin CJ-F, Wu J-L, Kuo C-M. 2001. Molecular Cloning, Developmental Expression, and Hormonal Regulation of Zebrafish (*Danio rerio*) β Crystallin B1, a Member of the Superfamily of β Crystallin Proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 285:105–110.
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernysky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ. 2011. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 43:491–498.
- Fagerholm PP, Philipson BT, Lindström B. 1981. Normal human lens—the distribution of protein. *Exp Eye Res* 33:615–620.
- Goishi K. 2006. A-crystallin expression prevents γ -crystallin insolubility and cataract formation in the zebrafish cloche mutant lens. *Development* 133:2585–2593.
- Greiling TM, Houck SA, Clark JI. 2009. The zebrafish lens proteome during development and aging. *Mol Vis* 15:2313.
- Greiling TMS, Aose M, Clark JI. 2010. Cell fate and differentiation of the developing ocular lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:1540–1546.
- Greiling TMS, Clark JI. 2012. New Insights into the Mechanism of Lens Development Using Zebra Fish. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Vol. 296. Elsevier. p 1–61.
- Gross JB, Protas M, Conrad M, Scheid PE, Vidal O, Jeffery WR, Borowsky R, Tabin CJ. 2008. Synteny and candidate gene prediction using an anchored linkage map of *Astyanax mexicanus*. *Proc Natl Acad Sci* 105:20106.
- Hinaux H, Pottin K, Chalhoub H, Père S, Elipot Y, Legendre L, Rétaux S. 2011. A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachón cavefish. *Zebrafish* 8:155–165.
- Hinaux H, Poulain J, Da Silva C, Noirot C, Jeffery WR, Casane D, Rétaux S. 2013. De Novo Sequencing of *Astyanax mexicanus* Surface Fish and Pachón Cavefish Transcriptomes Reveals Enrichment of Mutations in Cavefish Putative Eye Genes. *PLoS ONE* 8:e53553.
- Hooker L, Smoczer C, KhosrowShahian F, Wolanski M, Crawford MJ. 2012. Microarray-based identification of *Pitx3* targets during *Xenopus* embryogenesis. *Dev Dyn* 241:1487–1505.

- 1
- 2
- 3 Ishibashi S, Yasuda K. 2001. Distinct roles of *maf* genes during *Xenopus* lens development. *Mech Dev*
- 4 101:155–166.
- 5
- 6 Javonillo R, Malabarba LR, Weitzman SH, Burns JR. 2010. Relationships among major lineages of
- 7 characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data.
- 8 *Mol Phylogenet Evol* 54:498–511.
- 9
- 10 Jeffery W, Strickler A, Guiney S, Heyser D, Tomarev S. 2000. Prox 1 in eye degeneration and sensory
- 11 organ compensation during development and evolution of the cavefish *Astyanax*. *Dev Genes*
- 12 *Evol* 210:223–230.
- 13
- 14 Jeffery WR, Martasian DP. 1998. Evolution of Eye Regression in the Cavefish *Astyanax* : Apoptosis
- 15 and the *Pax-6* Gene. *Integr Comp Biol* 38:685–696.
- 16
- 17 Jeffery WR. 2008. Emerging model systems in evo-devo: cavefish and microevolution of
- 18 development. *Evol Dev* 10:265–272.
- 19
- 20 Jeffery WR. 2009. Regressive Evolution in *Astyanax* Cavefish. *Annu Rev Genet* 43:25–47.
- 21
- 22 De Jong WW, Leunissen JA, Voorter CE. 1993. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock
- 23 protein family. *Mol Biol Evol* 10:103–126.
- 24
- 25 Kim EB, Fang X, Fushan AA, Huang Z, Lobanov AV, Han L, Marino SM, Sun X, Turanov AA, Yang
- 26 P, Yim SH, Zhao X, Kasaikina MV, Stoletzki N, Peng C, Polak P, Xiong Z, Kiezun A, Zhu Y,
- 27 Chen Y, Kryukov GV, Zhang Q, Peshkin L, Yang L, Bronson RT, Buffenstein R, Wang B,
- 28 Han C, Li Q, Chen L, Zhao W, Sunyaev SR, Park TJ, Zhang G, Wang J, Gladyshev VN. 2011.
- 29 Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat.
- 30 *Nature* 479:223–227.
- 31
- 32 Litt M. 1998. Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the
- 33 human alpha crystallin gene CRYAA. *Hum Mol Genet* 7:471–474.
- 34
- 35 Mackay DS, Andley UP, Shiels A. 2003. Cell death triggered by a novel mutation in the alphaA-
- 36 crystallin gene underlies autosomal dominant cataract linked to chromosome 21q. *Eur J Hum*
- 37 *Genet* 11:784–793.
- 38
- 39 McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D,
- 40 Gabriel S, Daly M, DePristo MA. 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce
- 41 framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297–1303.
- 42
- 43 Nikitina NV, Maughan-Brown B, O’Riain MJ, Kidson SH. 2004. Postnatal development of the eye in
- 44 the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*). *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 277:317–
- 45 337.
- 46
- 47 Posner M, Skiba J, Brown M, Liang JO, Nussbaum J, Prior H. 2013. Loss of the small heat shock
- 48 protein α A-crystallin does not lead to detectable defects in early zebrafish lens development.
- 49 *Exp Eye Res* 116:227–233.
- 50
- 51 Saitou N, Nei M. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing
- 52 Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- 53
- 54 Strickler AG, Byerly MS, Jeffery WR. 2007a. Lens gene expression analysis reveals downregulation
- 55 of the anti-apoptotic chaperone α A-crystallin during cavefish eye degeneration. *Dev Genes*
- 56 *Evol* 217:771–782.
- 57
- 58
- 59
- 60

- Strickler AG, Yamamoto Y, Jeffery WR. 2007b. The lens controls cell survival in the retina: Evidence from the blind cavefish *Astyanax*. *Dev Biol* 311:512–523.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.
- Templeton JP, Wang X, Freeman NE, Ma Z, Lu A, Hejtmancik F, Geisert EE. 2013. A crystallin gene network in the mouse retina. *Exp Eye Res* 116:129–140.
- Wang H, Kesinger JW, Zhou Q, Wren JD, Martin G, Turner S, Tang Y, Frank MB, Centola M. 2008. Identification and characterization of zebrafish ocular formation genes. *Genome Natl Res Counc Can Génome Cons Natl Rech Can* 51:222–235.
- Wilkens H. 1988. Evolution and Genetics of Epigean and Cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the Neutral Mutation Theory. *Evol Biol* 23:271–367.
- Wistow G, Wyatt K, David L, Gao C, Bateman O, Bernstein S, Tomarev S, Segovia L, Slingsby C, Vihtelic T. 2005. γ N-crystallin and the evolution of the $\beta\gamma$ -crystallin superfamily in vertebrates: γ N-crystallin. *FEBS J* 272:2276–2291.
- Yamamoto Y, Jeffery WR. 2000. Central Role for the Lens in Cave Fish Eye Degeneration. *Science* 289:631–633.
- Zuckerlandl E, Pauling L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press. New York: V. Bryson and H.J. Vogel. p 97–166.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Phylogeny of Vertebrate crystallins of the beta family (A) and gamma family (B)

Neighbor Joining trees of vertebrate crystallin protein sequences. *Astyanax* sequences are landmarked with purple dots. Triangles indicate the orthology of the various sequences according to their names. *Takifugu rubripes crybb2* seems to belong to the *crybb3* subfamily.

Figure 2 Sequence variability in *Astyanax* crystallins

A Within synonymous changes, proportion of mutations (purple) and polymorphisms (green) in each population. Numbers on the graphs indicate the number of sites in each category.

B Within non-synonymous changes, proportion of mutations and polymorphisms in each population.

Figure 3 *In situ* hybridization screen of selected crystallins expression at 36hpf

A to R, Photographs *in toto* of whole-mount *in situ* hybridizations in lateral views for the 9 indicated crystallin genes in SF and CF. Anterior is right and dorsal is up. No expression of *crybgx* is detected in CF. A very faint expression of *crybb1c* seems to be present in CF. For *crybb1c* and *crybgx*, insets show sections through SF eye, counterstained with DAPI. Scale bar in A: 100µm.

Figure 4 *In situ* hybridizations for *crygmb* and *crygm5* at 60hpf

Photographs *in toto* of whole-mount *in situ* hybridizations in lateral views for *crygmb* and *crygm5* in SF and CF. No expression of *crygmb* is detected in CF. A faint expression of *crygm5* seems to be present in CF. Scale bar in A: 100µm.

Figure 5 Expression levels of 3 crystallins assessed with qPCR

Relative mRNA levels of *crybgx*, *crybb1c* and *crybb1a* in SF and CF were estimated by qPCR, using GAPDH as a reference gene, with triplicates.

Figure 6 Time course of *crybb1c* and *crybgx* expression

Photographs *in toto* of whole-mount *in situ* hybridizations in lateral views for *crybb1c* and *crybgx* in SF and CF at 28, 32 and 60hpf. *Crybgx* seems to be never expressed in CF. Scale bar in A: 100µm.

Figure 7 Effect of *crybgx* knockdown in zebrafish

Photograph of a zebrafish control eye (A) or *crybgx* morphant eye (B) after TUNEL labeling at 4dpf. For comparison, inset shows a CF eye at 2.5dpf after TUNEL labeling, undergoing massive apoptosis. C, Quantification of apoptotic cells in control and morphant lens. D, RT-PCR on mRNA extracted from control and MO-injected embryos shows the efficiency of the MO.

Figure 8 Rescue of *cryaa* expression in CF by transgenesis

A Scheme of the transgene. B Photograph of a transgenic CF larva, showing CFP fluorescence in the lens. C, Photograph of a transgenic CF adult, showing the lack of eye rescue.

Figure S1 Phylogeny of Vertebrate crystallins of the gamma family

Neighbor Joining trees of vertebrate crystallin protein sequences. *Astyanax* sequences are landmarked with purple dots. Triangles indicate the orthology of the various sequences according to their names.

Figure S2 Phylogeny of Vertebrate crystallins of the lambda (A), Mu (B), Zeta (C) and Gamma-Beta (D) family

Neighbor Joining trees of vertebrate crystallin protein sequences. *Astyanax* sequences are landmarked with purple dots.

Table 1: A summary table for crystallins studied in this paper.

Successive columns show (1) the “phylogenetic name” given after phylogenetic analysis, (2) the transcript contig name in our *Astyanax* transcriptome browser (Hinaux et al., 2013), (3) the corresponding Ensembl gene code in the preliminary Pachón genome released on 6 December 2013 (http://uswest.ensembl.org/Astyanax_mexicanus/Info/Index), (4) the position and nature of identified fixed mutations in CF protein sequences, and (5,6) the number of EST for each crystallin retrieved from our transcriptome sequencing (Sanger) in SF and CF. Note: according to the Pachón cavefish preliminary assembly, there would be a premature stop codon in the 5th exon of *crybgx*. However, the sequence is “unknown” only 28bp after this stop codon, and in a more recent transcriptome Illumina dataset (see Methods) obtained in the group, we do not find this premature stop codon.

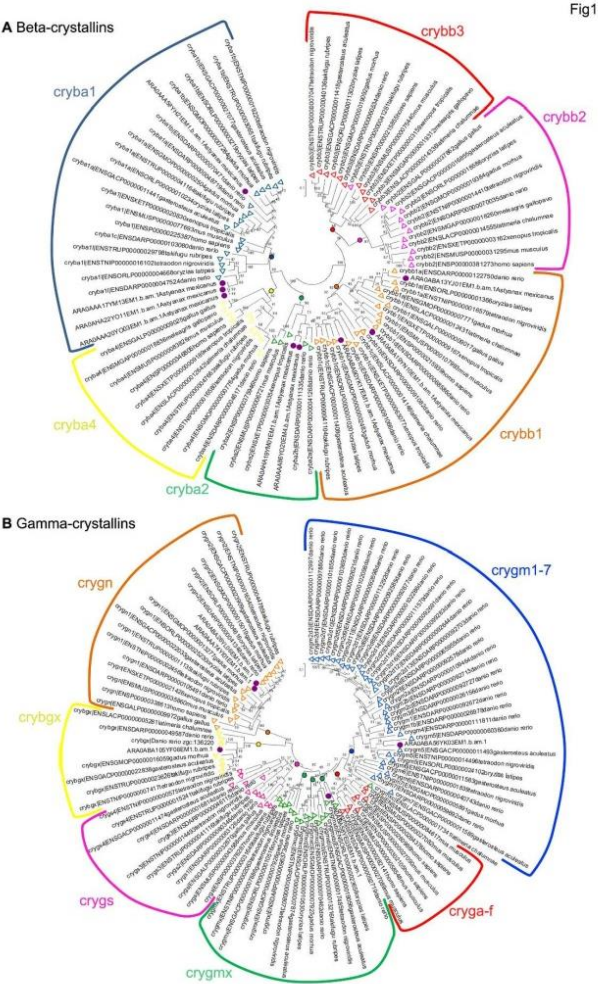


Figure 1 Phylogeny of Vertebrate crystallins of the beta family (A) and gamma family (B)
Neighbor Joining trees of vertebrate crystallin protein sequences. Astyanax sequences are landmarked with purple dots. Triangles indicate the orthology of the various sequences according to their names. Takifugu rubripes crybb2 seems to belong to the crybb3 subfamily.

179x292mm (300 x 300 DPI)

Fig2

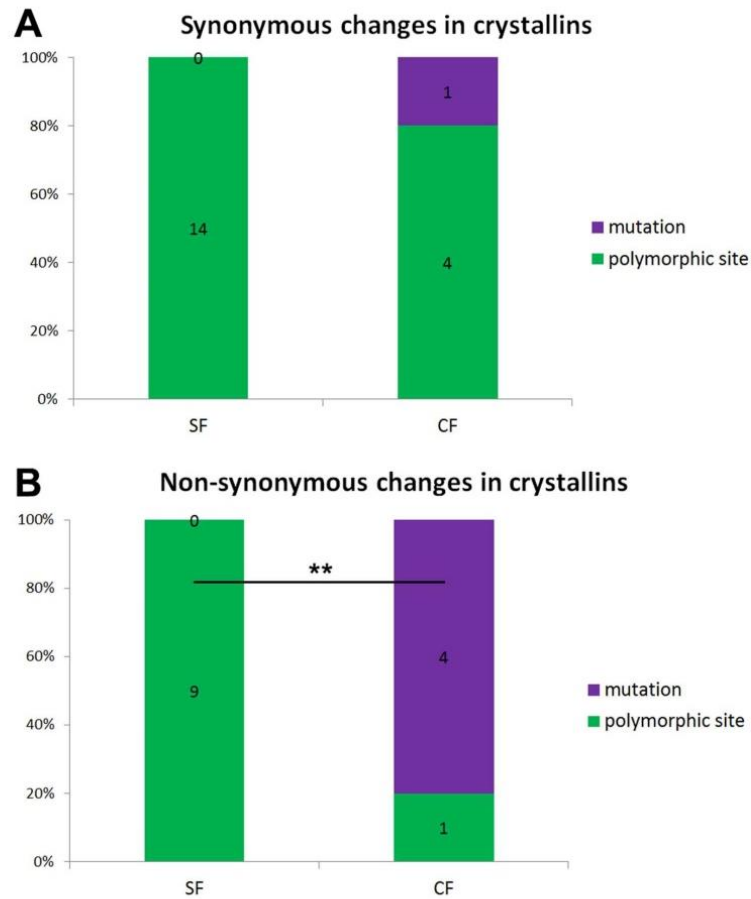


Figure 2 Sequence variability in *Astyanax* crystallins
A Within synonymous changes, proportion of mutations (purple) and polymorphisms (green) in each population. Numbers on the graphs indicate the number of sites in each category.
B Within non-synonymous changes, proportion of mutations and polymorphisms in each population.

91x112mm (300 x 300 DPI)

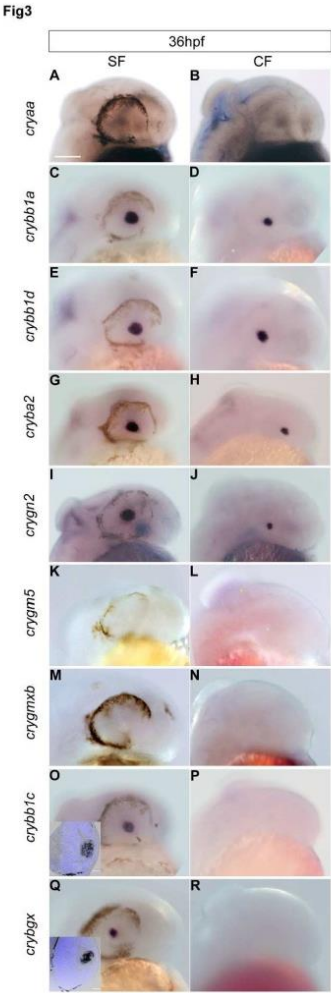


Figure 3 In situ hybridization screen of selected crystallins expression at 36hpf
A to R, Photographs in toto of whole-mount in situ hybridizations in lateral views for the 9 indicated crystallin genes in SF and CF. Anterior is right and dorsal is up. No expression of *crybgx* is detected in CF. A very faint expression of *crybb1c* seems to be present in CF. For *crybb1c* and *crybgx*, insets show sections through SF eye, counterstained with DAPI. Scale bar in A: 100µm.

110x295mm (300 x 300 DPI)

Fig4

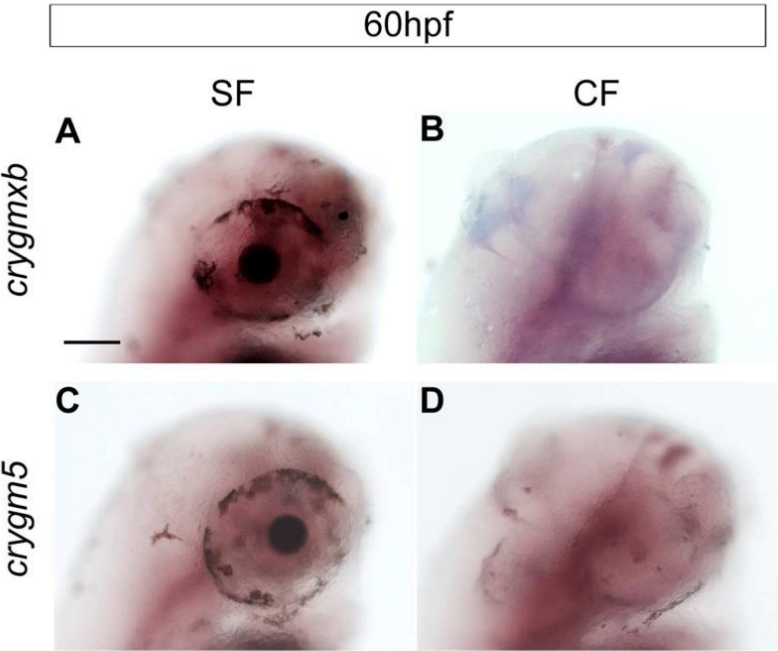


Figure 4 In situ hybridizations for *crygmb* and *crygm5* at 60hpf
Photographs in toto of whole-mount in situ hybridizations in lateral views for *crygmb* and *crygm5* in SF and CF. No expression of *crygmb* is detected in CF. A faint expression of *crygm5* seems to be present in CF.
Scale bar in A: 100µm.

100x110mm (300 x 300 DPI)

Fig5

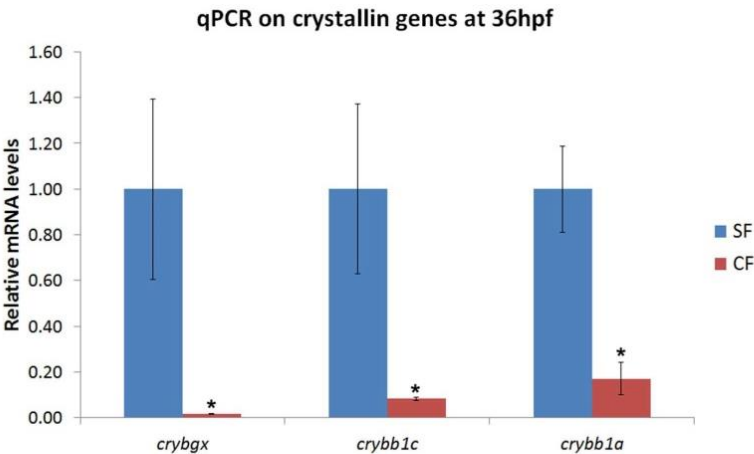


Figure 5 Expression levels of 3 crystallins assessed with qPCR
Relative mRNA levels of *crybgx*, *crybb1c* and *crybb1a* in SF and CF were estimated by qPCR, using GAPDH as a reference gene, with triplicates.

88x62mm (300 x 300 DPI)

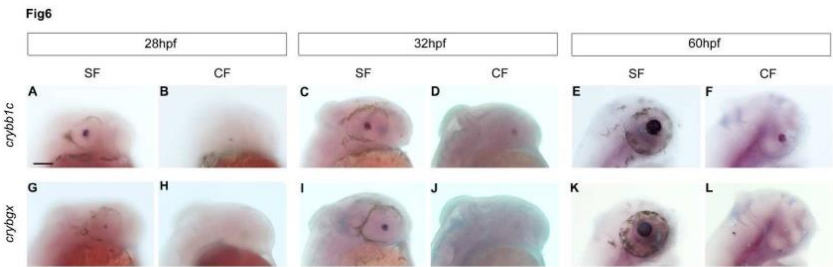


Figure 6 Time course of *crybb1c* and *crybgx* expression
Photographs in toto of whole-mount in situ hybridizations in lateral views for *crybb1c* and *crybgx* in SF and CF at 28, 32 and 60hpf. *Crybgx* seems to be never expressed in CF. Scale bar in A: 100µm.

280x90mm (300 x 300 DPI)

Fig7

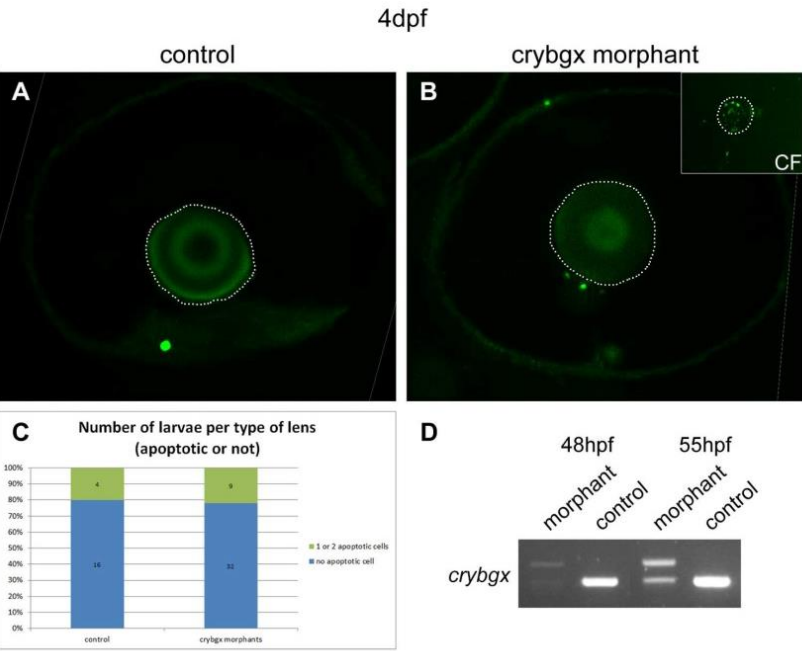


Figure 7 Effect of crybgx knockdown in zebrafish
Photograph of a zebrafish control eye (A) or crybgx morphant eye (B) after TUNEL labeling at 4dpf. For comparison, inset shows a CF eye at 2.5dpf after TUNEL labeling, undergoing massive apoptosis. C, Quantification of apoptotic cells in control and morphant lens. D, RT-PCR on mRNA extracted from control and MO-injected embryos shows the efficiency of the MO.

141x136mm (300 x 300 DPI)

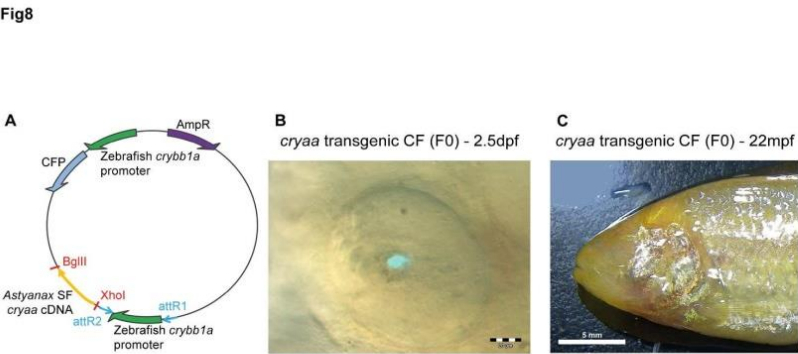


Figure 8 Rescue of *cryaa* expression in CF by transgenesis
A Scheme of the transgene. B Photograph of a transgenic CF larva, showing CFP fluorescence in the lens. C, Photograph of a transgenic CF adult, showing the lack of eye rescue.

219x98mm (300 x 300 DPI)

phylogenetic annotation	transcript contig name	Ensembl gene code
cryba1b	ARA0AAA58YH21EM1.b.am.1	ENSAMXG00000019822
cryba1l	ARA0AAA17YM13EM1.b.am.1	ENSAMXG00000013063
	ARA0AHA22YO11EM1.b.am.1	
	ARA0AAA20YO03EM1.b.am.1	
cryba2	ARA0AHA19YM01EM1.b.am.1	ENSAMXG00000002203
	ARA0AAA86YO20EM4.b.am.1	
crybb1a	ARA0ABA13YJ01EM1.b.am.1	ENSAMXG00000009325?
crybb1d	ARA0ABA19YN10EM1.b.am.1	ENSAMXG00000013053
crybb1c	ARA0ABA90YK17EM1.b.am.1	ENSAMXG00000017742
crygn2	ARA0ABA26YL06EM1.b.am.1	ENSAMXG00000018024
	ARA0AAA74YI01EM1.b.am.1	
crybgx	ARA0ABA105YF08EM1.b.am.1	ENSAMXG00000006190
crygmx	ARA0ABA58YE03EM1.b.am.1	ENSAMXG00000010864 (exons 5-6)
crygm5	ARA0ABA56YK03EM1.b.am.1	ENSAMXG00000010864 (exons 6-7-8)
cryzl1	ARA0ADA47YD17EM1.b.am.1	ENSAMXG00000012452
crym	ARA0AAA98YN19EM1.b.am.1	ENSAMXG00000008929
cryl1	ARA0ABA18YD12EM1.b.am.1	ENSAMXG00000005498
	ARA0AAA39YP23EM1.b.am.1	
crybg3	ARA0ABA21YF17EM1.b.am.1	ENSAMXG00000008917

SF/CF non synonymous fixed differences	SF Sanger EST number	CF Sanger EST number
Mutation in CF 96R>H	25	1
	2	1
	1	0
	61	4
	1	0
	25	1
Mutations in CF 113G>V and 180V>M	1	0
	9	0
	1	0
	1	0
	32	1
NA	11	0
	2	0
NA	1	0
NA	1	0
	0	1
	1	1
	3	0
	1	1
Mutation in CF 601R>C	1	1

III. Discussion

Ce travail a permis des avancées sur la phylogénie, les séquences, l'expression, et la fonction des cristallines chez l'*Astyanax*.

Le travail sur la phylogénie des cristallines a permis d'attribuer des noms précis aux différentes cristallines étudiées, et de revenir également sur la dénomination de cristallines qui avaient été étudiées dans des articles d'autres équipes (Jeffery et al., 2000; Strickler et al., 2007b).

L'étude des séquences a montré que les cristallines des CF accumulaient beaucoup de mutations non synonymes vu leur niveau de polymorphisme, comparés aux SF. Cela pourrait être dû au fait que la sélection est relâchée sur ces séquences.

Concernant les données obtenues par hybridation *in situ*, sur les 8 nouvelles cristallines étudiées, 4 présentent des différences d'expression entre SF et CF. Les cristallines *crybgx* et *crybb1c* ont une expression réduite voire absente chez les CF à 36 hpf. Les cristallines *crygmx* et *crygm5*, exprimées seulement à partir de 60 hpf dans le cristallin SF, ne le sont jamais chez les CF. Il semble donc qu'une proportion significative des cristallines ait une expression modifiée chez les CF. Il est probable qu'en plus des mutations dans les séquences codantes, les cristallines de CF accumulent des mutations dans les régions régulatrices. Cela pourrait être un nouvel indice du relâchement de la pression de sélection sur les gènes impliqués dans le développement ou le maintien de l'œil chez les CF.

La cristalline *crybgx* semblant être la plus intéressante candidate pour avoir un rôle dans l'apoptose du cristallin, son expression a été inhibée par injection de morpholino chez le poisson-zèbre. Le but de cette expérience était de vérifier si l'absence de cette seule cristalline pouvait provoquer une apoptose dans le cristallin. Le résultat s'est avéré négatif.

La cristalline αA , anti-apoptotique, qui a une expression réduite chez l'*Astyanax* CF et dont le gène est localisé au niveau d'un QTL de la taille des yeux (Andley, 2000; Gross et al., 2008; Strickler et al., 2007b), semblait également un bon candidat pour expliquer l'entrée en apoptose du cristallin. Nous avons donc choisi de restaurer son expression dans le cristallin de CF par une approche de transgénèse. Nous n'avons pas détecté d'amélioration de la dégénérescence de l'œil chez ces CF transgéniques par rapport aux contrôles en 1^e génération. Malheureusement, parmi les F0, aucun fondateur n'a été détecté, donc l'effet en F1 (avec une expression de *cryaa* homogène dans le cristallin) n'a pas pu être testé. Cependant, certains transgéniques de F0 avaient une expression forte de la CFP (et donc de la cristalline αA) dans une large portion du cristallin, sans amélioration du phénotype de l'œil, ce qui est un indice fort du fait que la cristalline αA seule ne peut pas sauver l'œil de CF.

Ainsi, il semble que, individuellement, les défauts d'expression de ces deux cristallines ne soient pas suffisants pour entraîner l'apoptose du cristallin. Mais ce travail a mis en évidence de nombreuses modifications des cristallines chez les CF, tant d'expression que de séquence. Il est donc possible que l'accumulation de tous ces défauts soit responsable de l'apoptose du cristallin. Une autre possibilité serait que l'une des mutations de cristallines ait un effet majeur, qui empêcherait le repliement correct de la protéine, et pourrait, en plus d'altérer sa fonction, provoquer des agrégations de protéines insolubles dans les cellules du cristallin, voire induire l'entrée en apoptose des cellules. A cet égard, il pourrait être intéressant d'étudier la transparence des fibres du cristallin en étudiant leur réflectance par microscopie confocale (Goishi, 2006). Enfin, il est possible qu'un autre défaut non détecté entraîne la dégénérescence du cristallin.

D. Evolution moléculaire du transcriptome chez *Astyanax mexicanus*

I. Introduction

Les études sur l'espèce *Astyanax mexicanus* ont longtemps été rendues difficiles par le fait qu'aucune donnée de séquençage massif n'existait, et que chaque gène d'intérêt devait être cloné par PCR dégénérée. Le poisson-zèbre, la plus proche espèce-modèle pour laquelle un génome est disponible, est trop éloignée d'*Astyanax*. Par exemple, il est impossible d'utiliser une sonde de poisson-zèbre pour réaliser une hybridation *in situ* sur l'*Astyanax*.

Dans l'équipe, il a donc été décidé de séquencer le transcriptome développemental des deux morphes du laboratoire, les SF issus du Texas, et les CF Pachón. Les stades embryonnaires sélectionnés devaient permettre d'obtenir les séquences de la plupart des gènes de développement, ainsi que celles des gènes exprimés au moment de l'apoptose du cristallin puis de la rétine chez les CF. La méthode de séquençage choisie (Sanger) devait permettre d'obtenir des séquences de transcrits (ESTs) longues et de bonne qualité, et de conserver au laboratoire une banque de clones bactériens transformés par les plasmides comportant les différents ESTs. De cette façon, une ressource « banque cDNA » serait générée et le travail sur les séquences serait facilité.

Vue la méthode de séquençage choisie et le peu de profondeur de lectures qu'elle offre, il est difficile d'exploiter les résultats au point de vue des différences d'expression entre les 2 morphes. En revanche, vue la qualité des séquences, il s'est avéré possible de rechercher sans *a priori* dans l'ensemble des données des différences de séquence (comme des substitutions) entre les deux morphes.

II. Article publié dans *Plos One*

De Novo Sequencing of *Astyanax mexicanus* Surface Fish and Pachón Cavefish Transcriptomes Reveals Enrichment of Mutations in Cavefish Putative Eye Genes

Hélène Hinaux¹, Julie Poulain^{2,3}, Corinne Da Silva^{2,3}, Céline Noirot^{3,4}, William R. Jeffery⁴, Didier Casane⁵, Sylvie Rétaux^{1*}

1 DECA Group, N&D Laboratory, CNRS, Gif sur Yvette, France, **2** Génomscope-CEA Sequencing Center, Evry, France, **3** INRA Bioinformatics Platform, Toulouse, France, **4** Department of Biology, University of Maryland, College Park, Maryland, United States of America, **5** LEGS, CNRS Gif sur Yvette and Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, France

Abstract

Astyanax mexicanus, a teleost species with surface dwelling (surface fish) and cave adapted (cavefish) morphs, is an important model system in evolutionary developmental biology (evo devo). *Astyanax* cavefish differ from surface fish in numerous traits, including the enhancement of non-visual sensory systems, and the loss of eyes and pigmentation. The genetic bases for these differences are not fully understood as genomic and transcriptomic data are lacking. We here present *de novo* transcriptome sequencing of embryonic and larval stages of a surface fish population and a cavefish population originating from the Pachón cave using the Sanger method. This effort represents the first large scale sequence and clone resource for the *Astyanax* research community. The analysis of these sequences show low levels of polymorphism in cavefish compared to surface fish, confirming previous studies on a small number of genes. A high proportion of the genes mutated in cavefish are known to be expressed in the zebrafish visual system. Such a high number of mutations in cavefish putative eye genes may be explained by relaxed selection for vision during the evolution in the absence of light. Based on these sequence differences, we provide a list of 11 genes that are potential candidates for having a role in cavefish visual system degeneration.

Citation: Hinaux H, Poulain J, Da Silva C, Noirot C, Jeffery WR, et al. (2013) De Novo Sequencing of *Astyanax mexicanus* Surface Fish and Pachón Cavefish Transcriptomes Reveals Enrichment of Mutations in Cavefish Putative Eye Genes. PLoS ONE 8(1): e53553. doi:10.1371/journal.pone.0053553

Editor: Ali Torkamani, The Scripps Research Institute, United States of America

Received: October 5, 2012; **Accepted:** November 29, 2012; **Published:** January 9, 2013

Copyright: © 2013 Hinaux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by an Agence Nationale de la Recherche (ASTYCO) grant to SR and by a National Institutes of Health grant (EY014619) to WRJ. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: retaux@lnaf.cnrs-gif.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Astyanax mexicanus is a characiform fish consisting of distinct surface dwelling (surface fish) and cave adapted (cavefish) forms. The ancestors of cavefish were isolated in caves about a million-year ago (Ma) and have since adapted to this extreme environment, which is characterized by constant darkness and food scarcity. Cavefish differ from their surface counterparts in numerous morphological, physiological and behavioral traits, the most striking being that cavefish lack functional eyes and are de-pigmented, and generally have lower metabolic rates than surface fish [1–6]. Twenty-nine different cavefish populations have been discovered so far, and some of them were derived independently, allowing the study of parallel evolution [7]. Cavefish and surface fish are inter-fertile, making *Astyanax mexicanus* an outstanding genetic model for microevolution studies [1]. All the phenotypic changes in cavefish, including the loss of eyes and pigmentation, may be explained by different evolutionary mechanisms. The two main hypotheses are: (1) positive selection, either direct or indirect, for traits that are beneficial in the dark, (2) neutral evolution by genetic drift, for traits that are not under selection [8,9].

Neither genomic nor transcriptomic data are currently available for *Astyanax mexicanus*. The closest model species with a sequenced genome is the zebrafish *Danio rerio*, a cypriniform. The common ancestor of characiforms and cypriniforms diverged at least 100 Ma [10,11] and could even be more distantly related (>200 Ma), rendering some comparisons difficult [12]. The genetic bases of adaptation to life in caves have thus remained elusive. From studies in other model organisms, it was proposed that phenotypic evolution can be explained in part by changes in non-coding regulatory sequences: for example, in stickleback *Gasterosteus aculeatus*, pelvic spine reduction during the transition from marine to freshwater environments is due to the deletion of a *Pitx1* enhancer [13,14]. However, phenotypic changes can also be based on mutations in coding sequences. For instance, the reduction or loss of pigmentation in *Astyanax mexicanus* cavefish is due to mutations in the *Mc1r* and *Oca2* coding sequences [15,16]. A few other coding sequences were investigated in *Astyanax* in attempts to understand the genetic bases for cavefish eye degeneration. On the one hand, the “master gene” for eye development, *Pax6*, was found to be identical in the two populations [17], while on the other hand, opsin gene sequences were found to accumulate C→T transitions in cavefish, as

a signature of pseudogenes formation [18]. These case studies are still limited to a small number of genes, due to the lack of sequence data. This situation will change in a near future, due to the ongoing Pachón cavefish genome project at the Washington University in Saint Louis.

In the context of a paucity of sequence information, understanding the evolutionary history of *Astyanax mexicanus* populations is also challenging. Relying on 6 microsatellite loci and mitochondrial DNA, it was shown that not all cave populations share the same origin [19]. More recently, using 26 microsatellite markers, Bradic et al. proposed a model with five independent origins of cave-adapted *Astyanax* in Mexico, with two invasion “waves” of surface fish into the subterranean environment establishing “old” and “new” cave populations [7]. Pachón cavefish, which shows the most severe eye degeneration and depigmentation phenotypes is the most studied cave population and belongs to the “old” populations [7]. In previous studies of the various cavefish populations, the genetic diversity was generally found to be lower in cavefish than in surface fish [7,19], possibly resulting from small effective population sizes because of food and space limitations or from population bottlenecks due to sporadic environmental degradations [20]. Obtaining large sequence datasets on *Astyanax mexicanus* surface fish and cave populations to assess their genetic diversity would therefore also help understand their evolutionary history.

Here we have sequenced cDNA libraries from several different developmental stages of *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachón cavefish. The crucial need for long transcript sequences and the lack of a close reference genome led us to use the Sanger sequencing method. The inclusion of different developmental stages allowed scanning most of the developmental transcriptome, as well as the successive steps of eye development and degeneration in Pachón cavefish. About 200,000 clones were sequenced, providing a new resource for the *Astyanax* research community. These transcriptomic sequences were then used to compare the level of polymorphism in the coding sequences of the two *Astyanax* morphs at a larger scale than what was previously possible [7], and to identify fixed differences in coding sequences between surface fish and cavefish, which are candidates for being involved in some of their phenotypic differences.

Methods

Ethics Statement

Animals were treated according to the French and European regulations for handling of animals in research. SR's authorization for use of animals in research is number 91–116. Laboratory study uses exclusively embryos and early larvae from aquatic vertebrate (non-mammalian) animals and therefore did not require special authorizations. Field sampling was conducted with Mexican Permit Number 040396-213-03 granted to W. R. Jeffery. Fish were caught using nets. A small (4 mm²) tissue sample was excised from the caudal fin and stored in 100% ethanol before release of the fish at the point of capture. All efforts were made to minimize suffering.

Biological Material

Astyanax mexicanus surface and Pachón cavefish were obtained from the Jeffery lab (University of Maryland, College Park, MD) in 2004. Surface fish had initially been collected in San Solomon Spring, Balmorhea State Park, Texas. In our Gif sur Yvette facility, fish are maintained and bred at 23°C (cavefish) or 26°C (surface fish) on a 12:12 hour light/dark cycle in tap water. They are kept in groups of ~30 fish in large 120–200 liters tanks.

Spawning is induced in these breeding groups by changing tank water and shifting temperature (−4°C for surface fish, +4°C for cavefish). No selection for some reproductive individuals is performed, and breeding individuals are mixed, maximizing the retention of genetic diversity from generation to generation. We estimate that a maximum of 5 laboratory generations have occurred since the initial capture of surface fish and cavefish in the wild in 2000.

cDNA Libraries

Fish embryos and larvae were anaesthetized with MS222 (Sigma), immediately immersed in Trizol (Invitrogen), and frozen at −80°C. Fifty to 200 embryos/larvae originating from several independent spawns were pooled for each developmental stage of the two morphs. RNA extraction was performed using Trizol following the manufacturer's instructions.

Eight libraries were constructed in a pCMV-SPORT6 derivative (polylinker region modified to include SfiI-sites for compatibility with directional cloning). This vector includes a CMV promoter for expression and a T7 promoter for antisense probe production. RNA was reverse-transcribed with Mint reverse transcriptase (MMLV-based, Evrogen) and cDNA was ligated into pCMV-Sport6 vector by LGC Genomics (Berlin). The Mint Universal cDNA Synthesis Kit and the Trimmer Normalization Kit (both from Evrogen) were used. The 8 ligation products corresponding to the 8 libraries (2 normalized, 6 non-normalized) were transformed into *E. coli* DH10B phageT1 resistant bacteria at the Genoscope (Evry, France). Clones were arrayed onto 384 multiwell plates and sequenced using Sanger technology.

Cleaning of the ESTs Sequences

198,380 Sanger ESTs (Expressed Sequence Tags) were obtained from the sequencing of the 8 libraries. The mean length of reads was 1,364 bp. 44 additional *A. mexicanus* mRNAs were also recovered from GenBank database (Table S1A).

Sanger sequences were cleaned with Seqclean with the following options: i\ vector sequence pCMV_sport6, and ii\ contaminant sequences of yeast, *E. coli*536, and phage sequences from Genbank phage division. Then, low quality sequences at the extremities and very short sequences were removed with Prinseq [21], with the following parameters: window of 30, step of 5, minimal length 100 bp. A description of the libraries generated before and after cleaning is provided in Fig S1. ESTs sequences were submitted to Genbank under accession numbers FO203528 to FO393391.

Assembly and Annotation Procedure

Assembly of Sanger sequences was carried out using TGICL software [22]. This software uses the CAP3 assembler [23] that takes into account the quality of sequenced nucleotides into the computation of the alignment score. The choice for using TGICL software is justified by its good performance for *de novo* assembly of long ESTs [24]. Moreover, TGICL generates less chimeric contigs than the more recent Newbler software [25]. 44,145 contigs were generated, including 29,114 singlets.

These contigs were annotated with the Biotoul platform pipeline, firstly performing BLAST against the following databases: i\ Reference databases: UniProtKB, RefSeq Protein and RNA, Pfam; ii\ TIGR fishes databases; iii\ UniGene fishes species; iv\ Ensembl fishes Transcripts (a detailed list of databases and versions is given in Table S1B). Gene ontology (GO) terms associated to each contig best hit (from TrEMBL, RefSeq or Swissprot databases) were analyzed using Blast2GO v.2.5.1 [26] to build a pie chart of their frequency distribution.

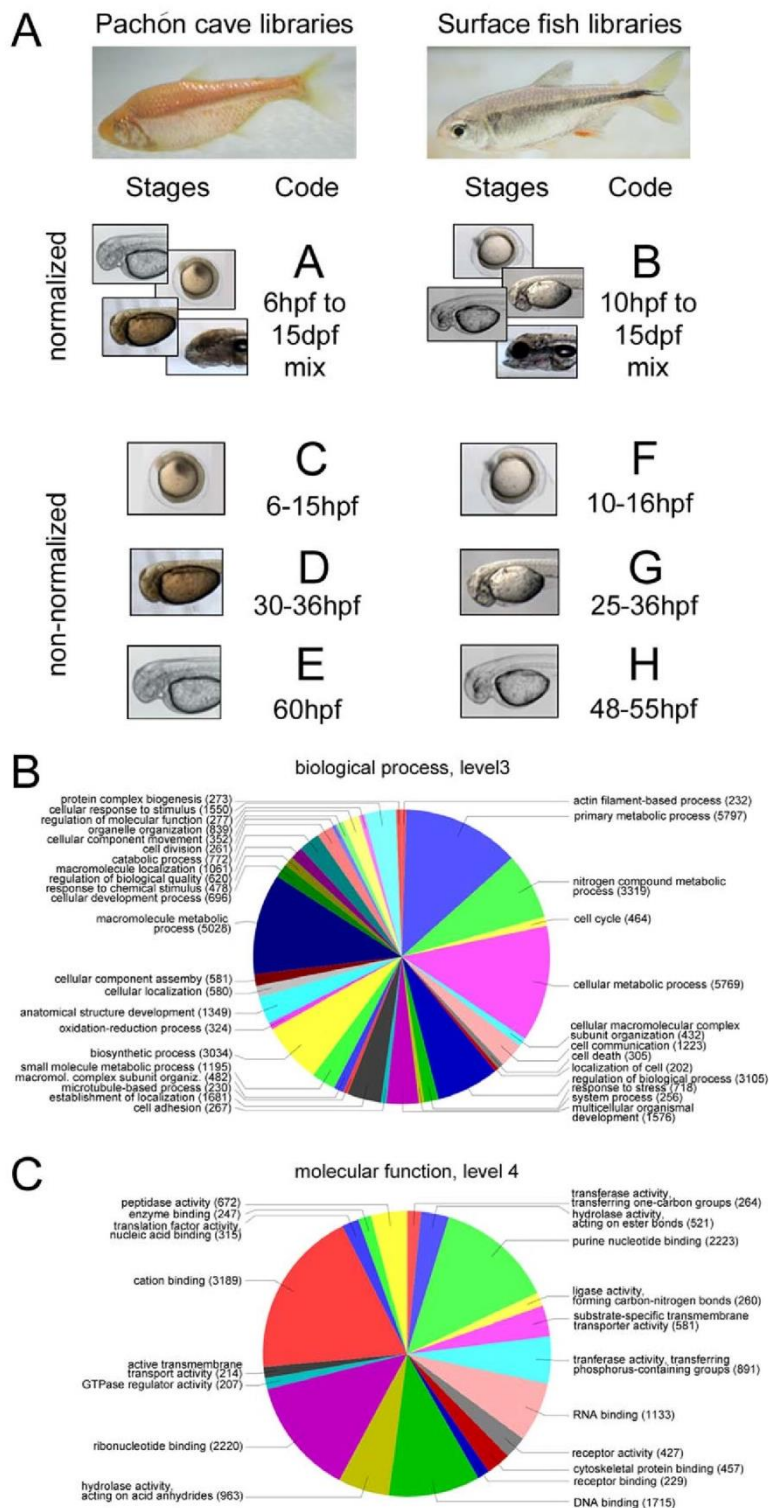


Figure 1. Composition and quality of the *Astyanax* cDNA libraries. A: Composition of the 8 *Astyanax* developmental cDNA libraries. Biological process (B) and molecular function (C) gene ontology pie charts of the 17,152 contigs annotated for GO term. doi:10.1371/journal.pone.0053553.g001

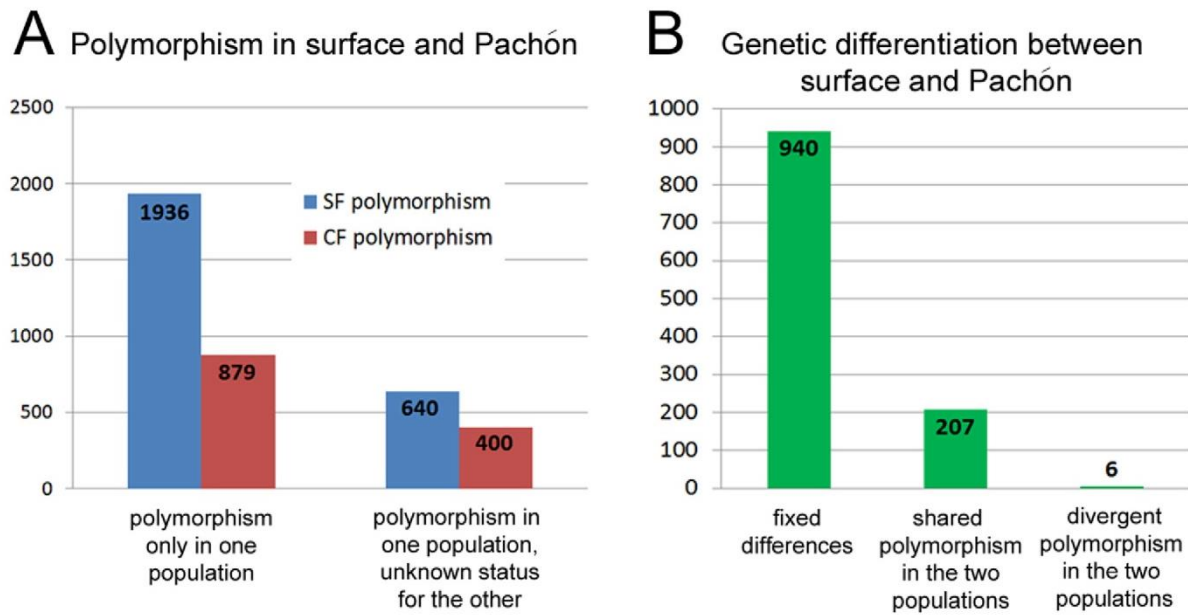


Figure 2. Types of polymorphism uncovered in the surface fish and cavefish transcriptomes. A: Number of polymorphic positions in the nucleotide sequences of the two *Astyanax* morphs. B: Number of fixed nucleotide differences, shared polymorphisms and divergent polymorphisms. doi:10.1371/journal.pone.0053553.g002

The repeat sequences were detected by RepeatMasker [27]. All those annotations were loaded into an EnsEMBL-like browser called Contigbrowser. Browsing Unigene *Astyanax* contigs and data mining by BioMart are available at <http://genotoul-contigbrowser.toulouse.inra.fr:9099>.

Polymorphism Analysis

Non-singlets contigs were blasted against the zebrafish proteome (Zv9 assembly, downloaded from EnsEMBL [28]), the closest species with a sequenced genome, to annotate them. Only one contig per zebrafish hit was kept, to avoid artificial increase of polymorphism by counting twice the same polymorphic site detected in two different contigs. When multiple contigs blasted on the same zebrafish protein, the contig with the largest depth was selected. In total 6,431 contigs were retained. ESTs for these contigs were modified so that each nucleotide with a quality score below 20 was replaced by 'N' and they were then realigned to their respective contig by Megablast (parameters: opening gap cost 0, penalty for mismatch -2), which is a more stringent alignment algorithm than the assembling software. This allowed regions where ESTs did not align properly to the contig to be discarded. Then in the aligned regions, ESTs were compared to the reference contig sequence (BLAST results were processed using the Bio::SearchIO module of BioPerl toolkit [29]). Polymorphism analysis was performed independently for cavefish and surface fish, and the minimal depth for each morph was set to be 4. With a depth of 4, two representatives of the minor allele had to be present at a given position to be considered polymorphic, and the minimal occurrence required for the minor allele increased with the depth D . Two conditions had to be fulfilled for the minor allele not to be discarded: firstly there had to be enough occurrences of this allele to eliminate the likelihood of an error; secondly it had to be present at a frequency that made sense considering the biological samples that were sequenced.

The first threshold was determined by estimating that the rate of error was mostly dependent on the Mint reverse transcriptase, which is supposed to make an error every 30,000 nucleotides [30] (Sanger sequencing error rate is comparatively much lower). To be stringent we estimated that the global error rate was 10^{-4} and used a binomial law to calculate the probability to have k errors at a position of depth D (k being the occurrence of the minor allele). To take into account the fact that in each contig errors can occur at all sites, we used the probability calculated above and a binomial law to calculate the probability to have at least one position with k errors among all the positions of the contig. As the mean length of contigs is 985 bp, we calculated this probability for a length of 1,000 bp. If the occurrences of the minor allele could be explained by errors with a probability higher than 0.01, the putative polymorphic site was not retained.

Regarding the second threshold, we estimated that at least 10 individuals of each morph had been involved in the breeding that gave rise to the sampled embryos. With a stringent assumption (no more than 10 individuals), 20 alleles at most would be present in the sampled embryos. It would thus be impossible to observe an allele with a frequency lower than 0.05.

The polymorphisms were then sorted into different classes: (1) "shared polymorphism" for positions at which both cavefish and surface fish sequences were polymorphic, and with the same alleles, (2) "divergent polymorphism" for positions where both cavefish and surface fish sequences were polymorphic but with different alleles, (3) "polymorphism in one morph only" when either cavefish or surface fish was polymorphic and the depth was equal or higher than 4 in the other morph, (4) "polymorphism in one morph, unknown status for the other morph" at positions where the apparently non-polymorphic morph had insufficient depth.

Fixed differences between the two morphs were also analyzed at positions where the depth for each one was at least 4, and where all cavefish shared the same allele and all surface fish shared

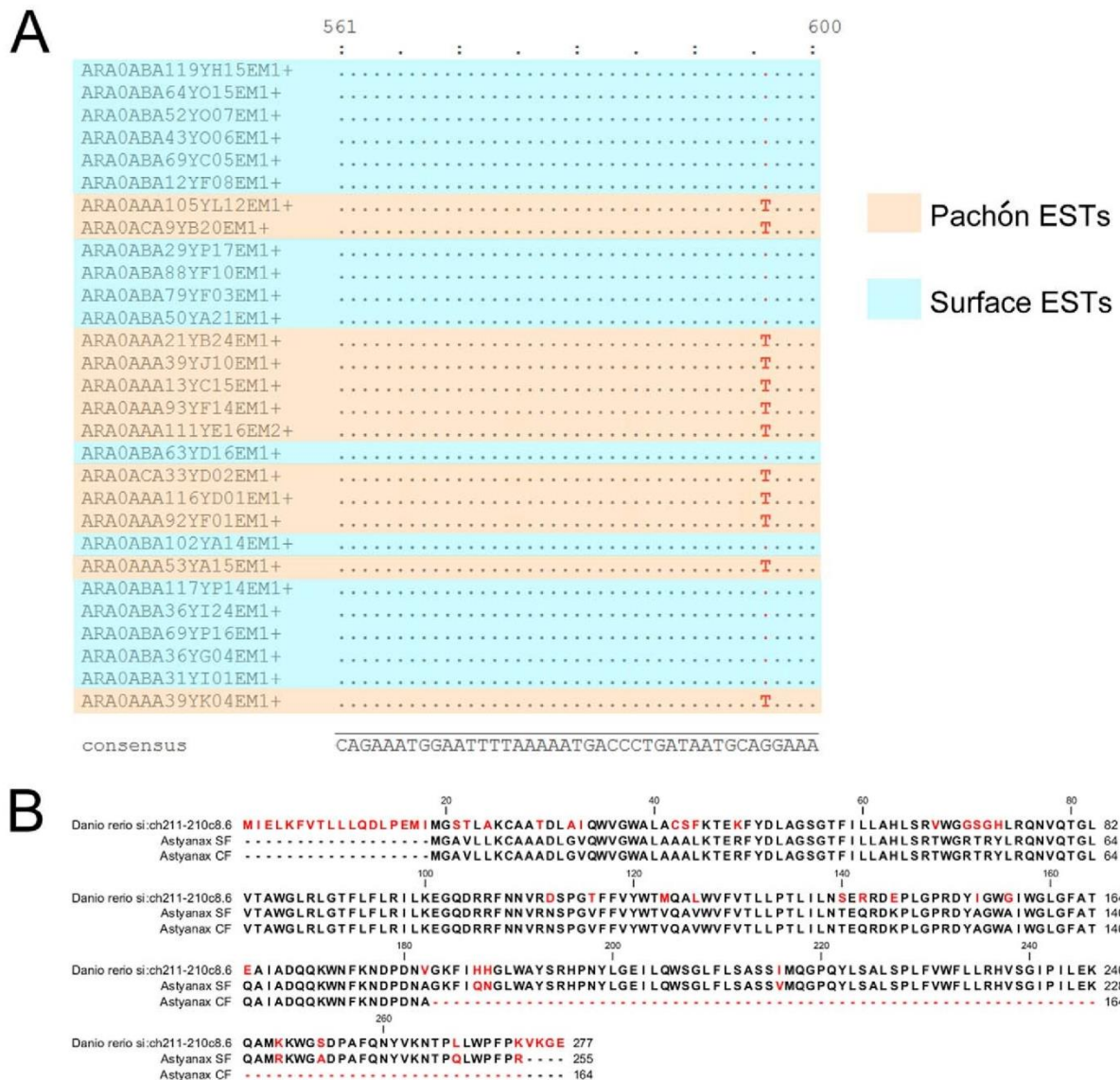


Figure 3. Premature stop codon in a cavefish sequence. A: Alignment of surface fish and Pachón cavefish nucleotide sequences of the si:ch211-210c8.6 transcript. B: Alignment of surface, Pachón and zebrafish translated protein sequences.
doi:10.1371/journal.pone.0053553.g003

another allele. Cavefish and surface fish transcripts were then translated into proteins and aligned with the corresponding zebrafish protein, which allows for eliminating the contig regions that were non-coding. The coding regions of the translated surface fish and cavefish contigs were then compared in order to identify non-synonymous substitutions. The amino-acid substitutions between the two morphs were oriented using *Danio rerio* proteins as outgroups. In order to detect radical substitutions, amino acids were categorized into 6 distinct classes: hydrophobic, aromatic, polar neutral, acidic, basic, and proline. The expression pattern of the genes with radical mutations was searched for using the Zfin database [31]. The enrichment for genes expressed in the eyes was statistically tested using Fisher's exact test. For genes with

mutations which had occurred in the cavefish lineage, the presence of conserved domains was identified using the Prosite [32] and NCBI Conserved Domain databases [33]. Several files containing a description of detected polymorphisms can be downloaded from the *Astyanax* browser.

The same approach was applied to detect population-specific indels, but no such indels were found in the contig coding sequences aligned to zebrafish proteins.

Orthology relationships were verified for all the cited potential candidate genes using Neighbor Joining phylogenetic analysis with Mega5 [34] (not shown).

Non-singlet contigs used in the polymorphism analysis were annotated for gene ontology term (GO term) using Ensembl

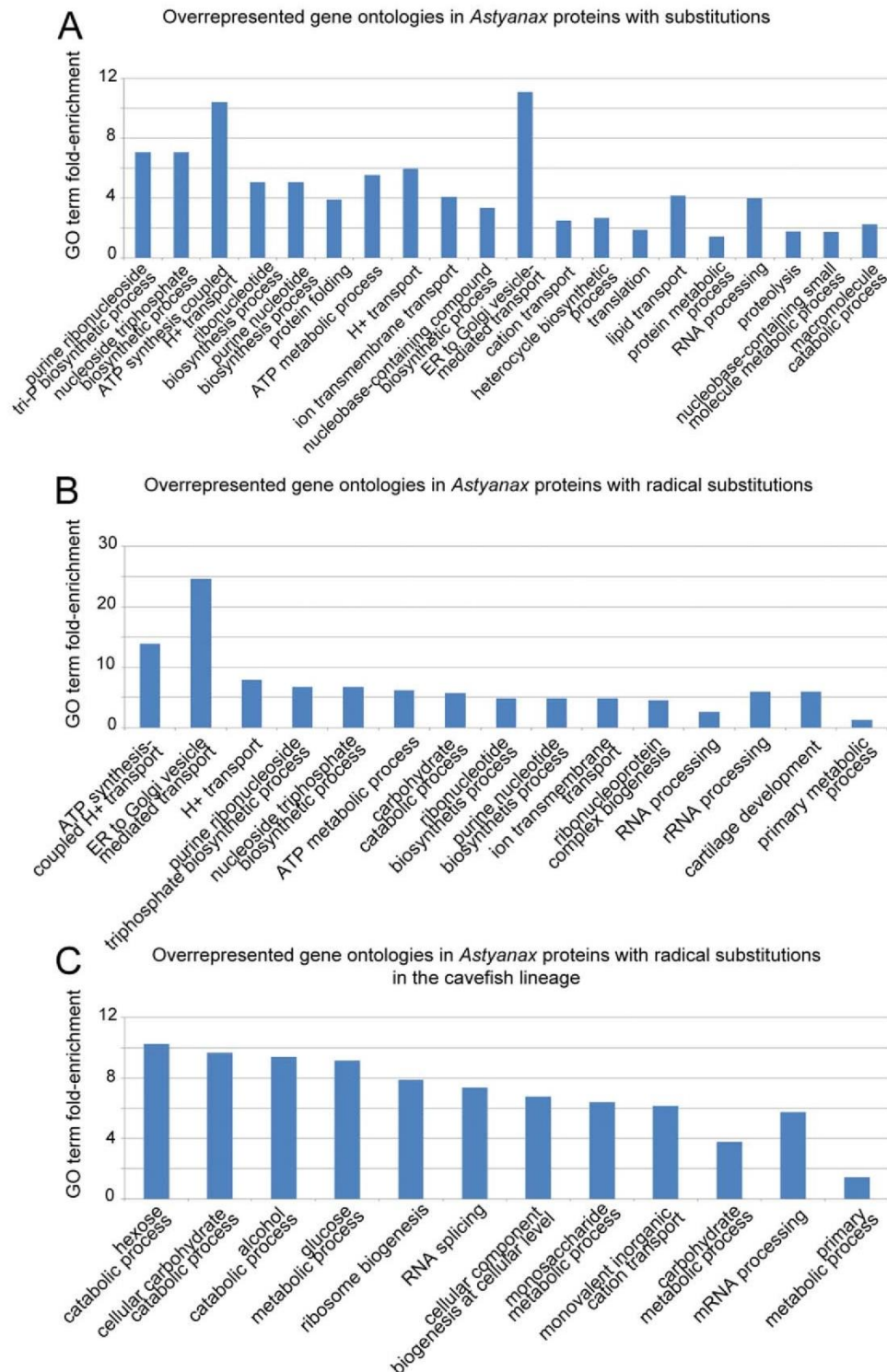


Figure 4. Overrepresented gene ontologies in *Astyanax* proteins with surface fish/cave fish substitutions (A), radical substitutions (B) or specifically with radical mutations in cavefish (C). GO terms are ordered by p-value. GO terms represented only once are not shown here.
doi:10.1371/journal.pone.0053553.g004

Table 1. Analysis of expression patterns for transcripts with radical mutations.

	number of genes	genes with no Zfin expression annotation	genes with Zfin expression annotation	genes expressed in the eye	% of annotated genes	% of total
mutations in cavefish lineage	31	10	21	11	52.4%	35.5%
mutations in surface fish lineage	22	8	14	1	7.1%	4.5%
mutations not oriented	28	9	19	3	15.8%	10.7%

2 genes contain 2 mutations, one that occurred in cavefish lineage, the other in surface fish lineage: these two genes are thus counted twice in this table.
doi:10.1371/journal.pone.0053553.t001

BioMart, and contigs with substitutions modifying the protein sequence were analyzed for GO term enrichment using conditional hypergeometrical test of GOSTATS R package [35].

Polymerase Chain Reaction on Genomic DNA

Astyanax mexicanus fin clips were collected in the wild in March 2008 by Bill Jeffery and Yoshiyuki Yamamoto (Mexican Permit Number 040396-213-03 granted to W. R. Jeffery). Fish were caught using nets. A small (4 mm²) tissue sample was excised from the caudal fin and stored in 100% ethanol before release of the fish at the point of capture. Surface fish fin clips originate from the Rio Valles near the village of Micos (San Luis Potosi, Mexico). Genomic DNA was extracted from these fin clips with standard phenol-chloroform protocol.

Srd5a PCR was performed using a first set of primers allowing the amplification of exons 4 and 5 (Fw 5' GGGTGTGTTTGTCACCTCTTCTGTC 3' and Rv 5' GCCCTCAGTACCTCAGTGCA 3') and then a semi-nested PCR using a different Fw primer (5' CGTGAC-TACGCTGGTTGGGC 3'). PCR fragments were sequenced using the following primer: 5' GGTCCGGTTTGTTCTGTCTGC 3' by GATC Company.

Results and Discussion

Eight *Astyanax* Cavefish and Surface Fish cDNA Libraries

Our aim was double: (1) to generate cDNA libraries from biologically relevant developmental stages for surface fish and cavefish as a clone resource, and (2) to generate transcriptome data for analysis of the genetic basis of cavefish evolution. Therefore, we extracted total RNA from 4 different stages of surface fish and Pachón cavefish embryos and larvae chosen according to the *Astyanax mexicanus* developmental staging table [36]: (1) gastrulae to neurulae (6–16 hpf), (2) hatched larvae (24–36 hpf), (3) swimming larvae (48–60 hpf) and (4) juveniles (2 weeks old). The first stage corresponds to the period in which the optic cup and lens placode are formed in surface fish and cavefish embryos. During the second stage, the cavefish but not the surface fish lens initiates apoptosis and arrests in differentiation. During the third stage, the retina begins to degenerate in cavefish, while in surface fish it is becoming functional. During the fourth stage, the cavefish eye continues to degenerate, whereas the surface fish eye undergoes normal growth. Thus the different stages chosen correspond not only to major developmental events but also to important time points in cavefish eye degeneration.

Fifty to 200 embryos/larvae originating from several independent spawns were pooled for each developmental stage and each morph, to be certain that the libraries were representative of the genetic diversity in the two *Astyanax* morphs. Indeed, in our fish facility, breeding occurs in large groups of approximately 30 individuals, so that every spawn is likely to contain the offspring of

multiple matings and thus retains the extent of the genetic diversity of their wild-caught ancestors in the RNA samples used to prepare the libraries.

Eight cDNA libraries were generated, 6 non-normalized and 2 normalized (Fig. 1A). Insertion of the cDNA into the vector was oriented, allowing the expression under control of the CMV promoter for those transcripts that are full-length. The mean insert size of the libraries is 900 bp.

Assembly and Annotation of the Sanger Sequences

Approximately 19,000 clones of each non-normalized library, as well as 43,000 clones of each normalized library were sequenced by the Sanger method (Fig S1B), and none of these libraries showed saturation (Fig S2), meaning that during the sequencing project when new clones were sequenced, they mostly corresponded to genes that had not been sequenced earlier in the project.

After removal of the vector, polyA sequences and poorly sequenced regions, the resulting ESTs had a mean length of 624 bp. 189,933 ESTs from all libraries were used to build 44,145 contigs. The mean length of the contigs is 985 bp, and the mean depth is 6.8. The contigs were annotated by BLAST analysis against several databases (see Methods and Table S1B). As a result, more than 90% of the contigs were annotated. When blasted against the zebrafish proteome, they corresponded to parts of 11,197 different proteins (among the 41,693 Ensembl zebrafish proteins). These proteins are encoded by 10,058 different genes (among the 32,469 Ensembl zebrafish genes). If the numbers of genes and proteins are similar in zebrafish and *Astyanax*, these contigs would then represent more than a quarter of the *Astyanax* proteome and a third of its genes (Table S2).

Moreover, 17,152 contigs were annotated for gene ontologies, and these gene ontologies are varied, thus the contigs appear to be representative of the *Astyanax* embryonic/larval transcriptome (Fig. 1BC).

The *Astyanax* transcriptomic sequences are available through the web browser <http://genotoul-contigbrowser.toulouse.inra.fr:9099>. They were also submitted to Genbank under accession numbers FO203528 to FO393391. They represent the first large scale sequence resource for this model species in ecodevo, and will be very useful to perform phylogenetic, expression and function studies.

Polymorphism Analysis

To further exploit the *Astyanax* sequence resource, we performed polymorphism analysis (Fig. 2). We blasted the 15,031 non-singlets contigs against the zebrafish proteome and selected one contig per zebrafish hit. Accordingly, 6,431 contigs were subsequently analyzed (see Methods).

As expected, polymorphic contigs were built with a relatively high number of ESTs from non-normalized libraries: 65.8% of the ESTs belonging to polymorphic contigs were derived from non-normalized libraries, whereas non-normalized libraries provided only 54.6% of the total number of sequenced ESTs.

Polymorphism was found to be approximately twice as high in surface fish compared to cavefish (Fig. 2A). This result confirms and extends with a large dataset the findings of previous studies based on a few microsatellites [7]. One explanation for this now established tendency is that cavefish have a smaller effective population size than surface fish, and possibly underwent population bottlenecks due to environmental variations. Cavefish and surface fish do share some polymorphic sites, but they have also fixed 940 different alleles (Fig. 2B).

Among the 940 fixed differences, 716 are synonymous. As the closest species (zebrafish) that can be used as an outgroup diverged at least 100 Ma, we assumed that several parallel nucleotide substitutions and reversions may have occurred in each lineage. We thus did not try to infer the direction of these nucleotide changes and did not investigate further the synonymous differences.

However, some of the 224 non-synonymous changes might be responsible for phenotypic differences observed between the two morphs. In addition, a premature stop codon in a cavefish sequence was detected (Fig. 3). The affected gene, a homolog to zebrafish *sich211-210c8.6*, is a member of the *srd5a* gene family according to our phylogenetic analysis (not shown), which encode enzymes involved in steroid hormones metabolism. We verified that this difference was also fixed in natural populations. We thus amplified exons 4 and 5 of this gene from genomic DNA extracted from fin clips of 4 wild-caught individuals of each morph: this confirmed that the premature stop codon is fixed in the natural Pachón population (not shown).

We also looked for indels specific for one of the two morphs but this analysis did not reveal any indels in coding sequences.

For the 224 amino acid substitutions found, the protein sequences were aligned to zebrafish to infer the direction of the substitutions, based on the principle of parsimony. Among them, 87 mutations had occurred in the cavefish lineage, and 65 mutations had occurred in the surface fish lineage; 72 others could not be oriented because the zebrafish amino acid at the mismatch position was different from both surface fish and cavefish amino acids.

To detect bias in the proteome evolution of surface fish and cavefish, we performed a GO term enrichment analysis on the pool of 184 genes in which the 224 substitutions were found. Surprisingly, ATP synthases seem to be over-represented among proteins with surface fish/cavefish substitutions (Fig. 4A).

Among the 224 amino acid substitutions, we found 83 radical substitutions, i.e., that correspond to amino acids with distinct physicochemical properties in the two morphs (see Methods). We performed the same analysis as above on the smaller pool of 79 genes in which the 83 radical amino acid substitutions were found, and detected the same over-representation of ATP synthases (Fig. 4B).

Within the 83 radical amino acid changes, 31 mutations had occurred in the cavefish lineage, and 22 mutations had occurred in the surface fish lineage. We found two genes for which the cavefish radical mutations are located at a highly conserved position (Fig S3): one is *fkbp7* (FK506-binding protein7), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase which is a molecular chaperone known to bind Hsp70 in the endoplasmic reticulum [37]. Another is *rpl13* (ribosomal protein L13), a component of the ribosome 60 S subunit. *Fkbp7* might be an interesting candidate for phenotypic

change as the deficiency in another chaperone (*hsp90α*) is known to play a role in the degeneration of the cavefish lens [38]. However the expression pattern of *fkbp7* is unknown in fish, thus the possibility of lens function is currently speculative in *Astyanax*. Nevertheless, the high conservation of the amino acid residues that are mutated in these two proteins suggests that cavefish *fkbp7* and *rpl13* could be non-functional in cavefish.

Other cavefish mutations are located in conserved domains, but not at highly conserved positions: *sec13*, involved in protein trafficking, is mutated in a WD40 domain; *capsla*, the calyphosine-like a, is mutated in a calcium-binding domain; the gametocyte specific factor 1 *Gtsf1* is mutated in a zinc finger domain; and the c-Myc binding protein *Mycbp* is mutated in a coiled-coil domain.

We next performed a GO term enrichment analysis on proteins with radical cavefish mutations: it appears that proteins involved in carbohydrate metabolism are overrepresented (Fig. 4C). It is already known that glycogen metabolism and gluconeogenesis are different in cave and surface populations and that cavefish have a lower fasting capacity [39]. It is thus possible that the 3 proteins mutated in CF and annotated with this GO term (*pgls*, *eno3* and *chia.3*) participate in this change of metabolism.

Finally, the expression patterns of the 79 transcripts with radical substitutions between surface fish and cavefish were investigated in Zfin, the zebrafish reference database [31]. Fifty-four of these transcripts had available expression patterns in Zfin. The analysis showed that 11 of the 21 (= 52.4%) transcripts with expression annotation and carrying a mutation in cavefish are expressed in the zebrafish eye, while only 1 of the 14 (= 7.1%) genes mutated in the surface fish lineage is expressed in this structure (Table 1). This difference is statistically significant ($p = 0.00972$; Fisher's exact test). These 11 transcripts are: *bcas2*, *fkbp3*, *mycbp*, *ndufv2*, *rpl13*, *rrp36*, *rrs1*, *eno3*, *capsla*, *sec13* and *selt1a*. Examples of genes mutated in cavefish, and expressed in the zebrafish visual system (retina and tectum), are shown in Fig S4 [40]. Of interest, during and after eye degeneration in Pachón, the tectum becomes largely hypomorphic [41]. The enrichment for mutations in putative eye genes in cavefish supports the hypothesis that these genes accumulate more mutations as a result of relaxed purifying selection on visual system genes in caves.

Conclusions

We present here *de novo* Sanger sequencing of the embryonic and larval transcriptomes of *Astyanax mexicanus* surface fish and cavefish. This is the first large scale sequence resource available for the *Astyanax* research community, which will increase the usefulness of this model species in evo devo research.

We also describe genetic variations within and between the two morphs. Polymorphism in cavefish seems to be much lower than in surface fish, and we describe 940 fixed differences between surface fish and cavefish coding sequences, some of them being potentially involved in adaptation to cave life.

Among the proteins showing radical substitutions in cavefish, a third are potentially expressed in the eye, based on their expression patterns in the zebrafish *in situ* hybridization database. The accumulation of mutations in putative eye genes may be allowed because of relaxed selection for vision in the dark cave environment. These genes also represent candidates for having a role in cavefish eye degeneration. If they do have a role in the degeneration process, it would support an involvement of genetic drift as a mechanism for cavefish eye loss.

Supporting Information

Figure S1 Technical description of the libraries. A Graphs showing read length frequency distribution (left) and average quality score along the reads (right) at the different stages of EST cleaning. B Table showing the number of EST sequences at the different stages of EST cleaning. (TIF)

Figure S2 Saturation curves of the libraries. Graph showing the number of clusters of sequences as a function of the number of cDNAs sequenced. (TIF)

Figure S3 Local alignments of proteins mutated at a highly conserved position in cavefish. Local alignments of *fkbp7* (A) and *rpl13* (B) protein orthologs in various chordate species. The position mutated in Pachón cavefish is highlighted in yellow. (TIF)

Figure S4 Expression patterns in zebrafish of six genes mutated in Pachón cavefish. Zebrafish *in situ* hybridizations (ZFIN database) showing expression of *ndufv2*, *bcas2*, *rrp36*, *rrs1*,

fkbp3 and *sec13* in eye and tectum. Taken from Thisse et al., 2004. (TIF)

Table S1 List of additional transcripts (Genbank IDs) used in contig assembly (A) and detailed list of databases used for contig annotation by Blast (B). (DOCX)

Table S2 Annotation statistics of the *Astyanax* contigs. (DOCX)

Acknowledgments

The authors would like to thank Stéphane Père and Magalie Bouvet for animal care and management of the fish facility, Lydia Steiner for her wise advices about bioinformatics, and Berthold Fartman for fruitful technical suggestions on library building.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HH SR WRJ DC. Performed the experiments: HH SR JP CDS CN. Analyzed the data: HH SR. Contributed reagents/materials/analysis tools: WRJ. Wrote the paper: HH SR WRJ DC.

References

- Jeffery W (2001) Cavefish as a Model System in Evolutionary Developmental Biology. *Developmental Biology* 231: 1–12. doi:10.1006/dbio.2000.0121.
- Yamamoto Y (2000) Central Role for the Lens in Cave Fish Eye Degeneration. *Science* 289: 631–633. doi:10.1126/science.289.5479.631.
- Pottin K, Hinaux H, Retaux S (2011) Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* 138: 2467–2476. doi:10.1242/dev.054106.
- Alunni A, Menuet A, Candal E, Pénigault J-B, Jeffery WR, et al. (2007) Developmental mechanisms for retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *J Comp Neurol* 505: 221–233. doi:10.1002/cne.21488.
- Yoshizawa M, Gorički S, Soares D, Jeffery WR (2010) Evolution of a Behavioral Shift Mediated by Superficial Neuromasts Helps Cavefish Find Food in Darkness. *Current Biology* 20: 1631–1636. doi:10.1016/j.cub.2010.07.017.
- Hüppop K (1986) Oxygen consumption of *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces): a comparison of epigeal and hypogeal populations. *Environmental Biology of Fishes* 17: 299–308. doi:10.1007/BF00001496.
- Bradic M, Beerd P, García-de León FJ, Esquivel-Bobadilla S, Borowsky RL (2012) Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evolutionary Biology* 12: 9. doi:10.1186/1471-2148-12-9.
- Wilkens H (2010) Genes, modules and the evolution of cave fish. *Heredity (Edinb)* 105: 413–422. doi:10.1038/hdy.2009.184.
- Jeffery WR (2010) Pleiotropy and eye degeneration in cavefish. *Heredity (Edinb)* 105: 495–496. doi:10.1038/hdy.2010.7.
- Peng Z, He S, Wang J, Wang W, Diogo R (2006) Mitochondrial molecular clocks and the origin of the major Otocephalan clades (Pisces: Teleostei): A new insight. *Gene* 370: 113–124. doi:10.1016/j.gene.2005.11.024.
- Briggs JC (2005) The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. *Journal of Biogeography* 32: 287–294. doi:10.1111/j.1365-2699.2004.01170.x.
- Nakatani M, Miya M, Mabuchi K, Saitoh K, Nishida M (2011) Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeal origin and Mesozoic radiation. *BMC Evolutionary Biology* 11: 177. doi:10.1186/1471-2148-11-177.
- Shapiro MD, Marks ME, Peichel CL, Blackman BK, Nereng KS, et al. (2004) Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature* 428: 717–723. doi:10.1038/nature02415.
- Chan YF, Marks ME, Jones FC, Villarreal G Jr, Shapiro MD, et al. (2010) Adaptive evolution of pelvic reduction in sticklebacks by recurrent deletion of a *Pitx1* enhancer. *Science* 327: 302–305. doi:10.1126/science.1182213.
- Protas ME, Hersey C, Kochanek D, Zhou Y, Wilkens H, et al. (2005) Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nature Genetics* 38: 107–111. doi:10.1038/ng1700.
- Gross JB, Borowsky R, Tabin CJ (2009) A novel role for *Mcl-1* in the parallel evolution of depigmentation in independent populations of the cavefish *Astyanax mexicanus*. *PLoS Genet* 5: e1000326. doi:10.1371/journal.pgen.1000326.
- Behrens M, Langecker TG, Wilkens H, Schmale H (1997) Comparative analysis of Pax-6 sequence and expression in the eye development of the blind cave fish *Astyanax fasciatus* and its epigeal conspecific. *Mol Biol Evol* 14: 299–308.
- Yokoyama S, Meany A, Wilkens H, Yokoyama R (1995) Initial mutational steps toward loss of opsin gene function in cavefish. *Mol Biol Evol* 12: 527–532.
- Strecker U, Bernatchez L, Wilkens H (2003) Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Ecology* 12: 699–710.
- Mitchell RW, Russell WH, Elliott WR (1977) Mexican eyeless characin fishes, genus *Astyanax*: environment, distribution, and evolution.
- Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27: 863–864. doi:10.1093/bioinformatics/btr026.
- Pertea G, Huang X, Liang F, Antonescu V, Sultana R, et al. (2003) TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics* 19: 651–652.
- Huang X, Madan A (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9: 868–877.
- Mundry M, Bornberg-Bauer E, Sammeth M, Feulner PGD (2012) Evaluating characteristics of de novo assembly software on 454 transcriptome data: a simulation approach. *PLoS ONE* 7: e31410. doi:10.1371/journal.pone.0031410.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380. doi:10.1038/nature03959.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, et al. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674–3676. doi:10.1093/bioinformatics/bti610.
- Tempel S (2012) Using and understanding RepeatMasker. *Methods Mol Biol* 859: 29–51. doi:10.1007/978-1-61779-603-6-2.
- Flicke P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, et al. (2011) Ensembl 2012. *Nucleic Acids Research* 40: D84–D90. doi:10.1093/nar/gkr991.
- Stajich JE, Block D, Boulez K, Brenner SE, Chervitz SA, et al. (2002) The Bioperl toolkit: Perl modules for the life sciences. *Genome Res* 12: 1611–1618. doi:10.1101/gr.361602.
- Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA (1988) The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242: 1171–1173.
- Bradford Y, Conlin T, Dunn N, Fashena D, Frazer K, et al. (2011) ZFIN: enhancements and updates to the Zebrafish Model Organism Database. *Nucleic Acids Res* 39: D822–829. doi:10.1093/nar/gkq1077.
- Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, et al. (2006) The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* 34: D227–230. doi:10.1093/nar/gkj063.
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, et al. (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39: D225–229. doi:10.1093/nar/gkq1189.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121.
- Falcon S, Gentleman R (2007) Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* 23: 257–258. doi:10.1093/bioinformatics/btl567.

36. Hinaux H, Pottin K, Chalhoub H, Père S, Elipot Y, et al. (2011) A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachón cavefish. *Zebrafish* 8: 155–165. doi:10.1089/zeb.2011.0713.
37. Zhang X, Wang Y, Li H, Zhang W, Wu D, et al. (2004) The mouse FKBP23 binds to BiP in ER and the binding of C-terminal domain is interrelated with Ca²⁺ concentration. *FEBS Lett* 559: 57–60. doi:10.1016/S0014-5793(04)00024-9.
38. Hooven TA, Yamamoto Y, Jeffery WR (2004) Blind cavefish and heat shock protein chaperones: a novel role for hsp90alpha in lens apoptosis. *Int J Dev Biol* 48: 731–738. doi:10.1387/jjdb.041874th.
39. Salin K, Voituron Y, Mourin J, Hervant F (2010) Cave colonization without fasting capacities: an example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol* 156: 451–457. doi:10.1016/j.cbpa.2010.03.030.
40. Thisse B, Thisse C (2004) Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. ZFTN Direct Data Submission.
41. Soares D, Yamamoto Y, Strickler AG, Jeffery WR (2004) The lens has a specific influence on optic nerve and tectum development in the blind cavefish *Astyanax*. *Dev Neurosci* 26: 308–317. doi:10.1159/000082272.

III. Discussion

Ces données de séquençage chez l'*Astyanax* ont permis d'obtenir une séquence de très bonne qualité pour de nombreux transcrits, correspondant à plus de 6000 gènes chez le poisson-zèbre. En comparaison des données préalablement disponibles, ce travail permet donc une grande avancée dans la connaissance moléculaire de cette espèce.

Bien sûr, ces données ne correspondent pas à l'intégralité du transcriptome, puisque l'on attend chez *Astyanax* environ 20000 gènes. Cette absence de 2/3 des gènes dans l'assemblage peut s'expliquer de 2 manières : d'abord, comme les échantillons séquencés correspondent à des stades jeunes, certains gènes qui commencent à être transcrits seulement tardivement chez les alevins peuvent ne pas être exprimés aux stades utilisés ici. Une autre explication est que le séquençage en Sanger ne permet pas une très grande profondeur, et que les gènes peu exprimés n'ont pas été détectés. Néanmoins, les séquences représentent un bon échantillon des gènes du poisson comme le montre l'analyse des GOterms : il n'y a pas de biais pour une catégorie de gènes.

D'autre part, la bonne qualité des séquences a permis d'étudier les polymorphismes et les substitutions. Ainsi, il a été possible d'estimer que le polymorphisme chez les CF est environ 2 fois plus faible que chez les SF, ce qui constitue l'un des principaux résultats du papier. En effet, comme nous avons pu le constater sur le terrain, les CF Pachón sont supposés vivre en plus petite population que les SF, et avoir peut-être même subi un goulot d'étranglement au cours de leur évolution dans les grottes, ce qui aurait fait chuter leur polymorphisme. L'étude d'allozymes a suggéré il y a longtemps déjà que les *Astyanax* de surface étaient beaucoup plus polymorphes que ceux de la grotte Pachón : 11.2% des 17 sites étudiés sont hétérozygotes chez les SF, tous étant monomorphes chez Pachón (Avice and Selander, 1972).

Concernant les substitutions, seules celles impactant la séquence protéique (non-synonymes) ont été étudiées. En effet, il était important de pouvoir déterminer la direction du changement (les mutations ont-elles eu lieu dans le lignage SF ou CF ?) en comparant les allèles des 2 morphes avec celui du poisson-zèbre. Or, comme le poisson-zèbre est éloigné phylogénétiquement de l'*Astyanax*, le même allèle (nucléotide) peut en fait correspondre à une convergence après plusieurs mutations. En se référant aux acides aminés, la probabilité de convergence est plus faible (il y a 20 acides aminés et seulement 4 nucléotides). Il faut d'ailleurs noter que, pour pallier à ce problème, nous avons séquencé depuis le transcriptome d'une espèce plus proche, pour qu'elle serve de groupe externe (cf article 3, et Fumey et al., in prep).

Parmi les substitutions non synonymes, 87 sont probablement des mutations chez les CF, 65 des mutations chez les SF. Ainsi, malgré un niveau de polymorphisme plus faible chez les CF, les

protéines accumulent autant voire un peu plus de mutations non synonymes que chez les SF. Ceci pourrait s'expliquer par la « théorie presque neutre » de l'évolution moléculaire : dans de petites populations (comme chez les CF), la sélection naturelle est moins efficace, et des mutations légèrement délétères peuvent s'accumuler (Ohta, 1992).

Les protéines impliquées dans le transport des protons ont accumulé en proportion plus de différences entre SF et CF. Une hypothèse pourrait être que ces protéines (en fait des ATP synthases), impliquées dans les couplages énergétiques de la chaîne mitochondriale, aient subi une sélection divergente entre SF et CF. Il est difficile d'imaginer quelle serait la pression de sélection. L'autre possibilité est que les ATP synthases sont codées en partie par des gènes mitochondriaux, qui accumulent plus de mutations que le génome nucléaire.

Certaines substitutions non synonymes peuvent avoir lieu entre des acides aminés aux propriétés physico-chimiques proches, et qui ont donc une probabilité forte d'être neutres. Nous nous sommes concentrés sur les substitutions radicales, qui modifient la catégorie d'acide aminé. Les mutations radicales chez les CF se sont accumulées davantage dans les gènes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates. Or le métabolisme des CF Pachón semble modifié par rapport aux SF : ils comportent plus de graisse et consomment moins d'oxygène que les SF, et perdent moins de poids en cas de jeûne (Wilkins, 1988). Une étude sur une population d'*Astyanax* CF indéterminée a également montré des différences métaboliques entre SF et CF, non concordantes cependant (Salin et al., 2010).

D'autre part, les CF Pachón accumulent davantage de mutations radicales que les SF dans les gènes exprimés dans l'œil. Ce pourrait être un signe du relâchement de la sélection sur ces gènes, qui n'ont plus une fonction vitale chez les CF, et qui accumulent donc progressivement des mutations (comme nous l'avons déjà constaté pour les cristallines). Dans le papier présenté, les patrons d'expression avaient été étudiés chez le poisson-zèbre en utilisant la base de données Zfin. Depuis, les hybridations *in situ* des 11 « gènes d'yeux » mutés chez le CF ont été réalisées à 36hpf, et ont permis de confirmer leur expression dans l'œil chez les 2 morphotypes d'*Astyanax* (Fig 78 et donnée non montrée, Alexandre Alié et Maryline Blin). De plus, au moins 8 de ces gènes sont exprimés dans la couche postérieure du toit optique (Fig 78), qui contient les cellules prolifératives de cette structure (Grandel et al., 2006). En plus de l'œil, les mutations des CF pourraient donc également affecter le développement et la prolifération du toit optique. Or le toit optique est de taille réduite chez les CF (Soares et al., 2004). Il a été postulé que cette taille réduite était secondaire à l'absence d'informations visuelles issues de l'œil dégénéré. En effet, la transplantation d'un cristallin de SF chez un CF permet d'augmenter la taille du toit optique, mais sans atteindre la taille de celui d'un SF (Soares et al., 2004). Il est donc possible d'imaginer que le toit optique ait aussi des défauts intrinsèques, peut-être liés à ces mutations.

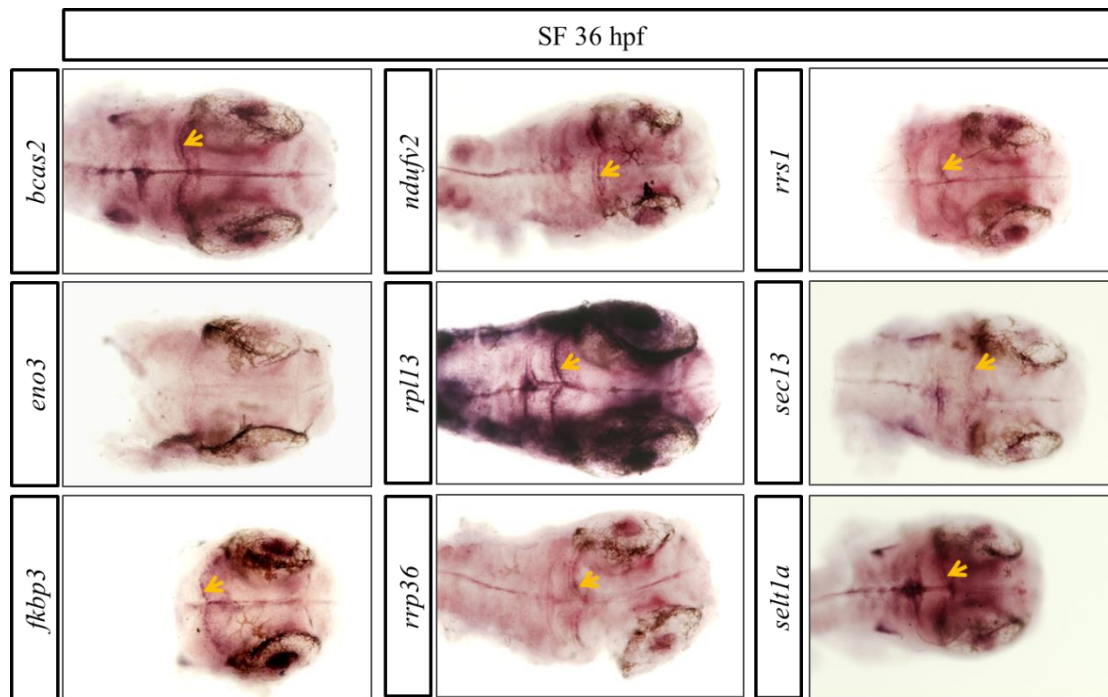


Figure 78 Patron d'expression chez l'*Astyanax* SF de 9 des 11 « gènes d'yeux » ayant une mutation radicale chez les CF. Hybridations *in situ* à 36 hpf, montées en vue dorsale. Les flèches jaunes indiquent l'expression dans la couche postérieure du toit optique (Alexandre Alié, Maryline Blin, non publié).

Le nombre assez important de polymorphismes partagés (~200 sites pour lesquels les SF et les CF sont polymorphes pour les mêmes allèles, à comparer aux 1000 différences fixées entre les 2 morphes) suggère que la divergence entre SF et CF ne doit pas être très ancienne. Cette analyse du polymorphisme a été répétée indépendamment sur des données de séquençage 454 puis Illumina (avec une profondeur et une couverture beaucoup plus importante donc), et a montré le même rapport entre sites polymorphes et substitutions (Fumey et al., in prep). D'après des simulations d'évolution, il semble même possible que l'essentiel des différences fixées entre SF et CF correspondent en fait à la fixation d'allèles différents à partir de sites polymorphes dans la population ancestrale, plutôt qu'à des mutations *de novo* (Fumey et al., in prep). Dans ce cas, la divergence entre SF et CF pourrait dater de seulement quelques dizaines de milliers d'années.

DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis, d'une part, de participer à l'établissement d'*Astyanax mexicanus* en tant qu'espèce-modèle à part entière, et d'autre part de contribuer à la compréhension de la dégénérescence de l'œil chez le CF Pachón. Nous discuterons de ces deux points, ainsi que des bases de l'adaptation au milieu cavernicole dans cette espèce.

A. *Astyanax mexicanus*, une espèce-modèle ?

Astyanax mexicanus a longtemps été considéré comme une espèce non modèle. Le peu d'outils disponibles et la relative difficulté de l'élevage rendaient en effet les études sur cette espèce fastidieuses. Les reproductions notamment s'effectuent en groupes et non en couples comme chez le poisson-zèbre, les pontes sont assez irrégulières et se produisent à une heure variable pendant la nuit. Tout cela rend fastidieuses les expériences qui impliquent des injections au stade une cellule.

Au fil des années cependant, de nombreuses techniques ont été mises en place : outre les hybridations *in situ* qui fonctionnent aussi bien que chez le poisson-zèbre, des expériences de surexpression par injection d'ARN messager au stade une cellule ont été réussies (Yamamoto et al., 2004), ainsi que des suivis de lignage cellulaire par iontophorèse de molécules fluorescentes (Pottin et al., 2011) et l'utilisation de morpholinos (Bilandžija et al., 2013)...

L'établissement d'une table de développement (Hinaux et al., 2011) et le séquençage du transcriptome développemental (Hinaux et al., 2013) ont participé à ce développement global de l'espèce en tant que modèle. Depuis, un autre projet de séquençage a permis d'augmenter encore la quantité de données sur le transcriptome chez l'adulte (Gross et al., 2013), et le génome du poisson cavernicole Pachón a été séquencé (McGaugh et al., in prep.). Dans notre équipe, les fécondations *in vitro* ont été mises au point, ainsi que la transgénèse (Elipot et al., submitted).

Toutes ces améliorations devraient rendre l'espèce attractive pour de nouvelles équipes. En tant que Vertébré cavernicole, *Astyanax* devient le modèle le plus établi (sauf si l'on inclut le rat-taupe dans les animaux cavernicoles). Et en tant que modèle de microévolution, *Astyanax* peut maintenant concurrencer l'épinoche.

B. Bases développementales de la perte de l'œil chez le poisson cavernicole *Astyanax mexicanus*

La dégénérescence de l'œil chez *Astyanax mexicanus* CF est l'un des phénotypes les plus marquants chez cet animal. Des études ont montré le rôle majeur du cristallin dans ce processus (Alunni et al., 2007; Jeffery and Martasian, 1998; Yamamoto and Jeffery, 2000).

Les deux articles sur le développement du cristallin présentés dans cette thèse permettent d'éliminer plusieurs hypothèses : l'apoptose du cristallin n'est pas le résultat d'un problème de spécification précoce, ni de sa petite taille, ni du seul défaut d'expression des cristallines *cryaa* ou *crybgx*.

Qu'est-ce qui peut donc expliquer la perte de l'œil chez CF ?

On peut imaginer qu'un gène majeur pour le développement du cristallin est muté. Mais lequel ? Pax6, Prox1 et Pitx3 semblent éliminés (Behrens et al., 1997; Jeffery et al., 2000, ce travail). Alors Maf ? Ces facteurs ont un rôle dans le développement des fibres du cristallin et dans la régulation des cristallines. Mais d'après des analyses préliminaires de nos données de transcriptome, leur séquence semble intacte chez CF Pachón. Alors Foxe3 ? L'expression de ce gène est sensible à la quantité de Pax6 (Blixt et al., 2007), donc il est probablement moins exprimé chez CF. Mais il est impliqué dans le développement de l'épithélium (Shi et al., 2006), qui est supposé « sain » chez CF.

Alternativement, on peut imaginer que le cristallin entre en apoptose suite à une accumulation de petits défauts de différenciation tardive. Plusieurs problèmes d'expression de cristallines sont désormais connus, mais pour ce que nous avons testé, ces absences d'expression n'ont pas d'effet individuel. Elles pourraient avoir un effet combiné. Mais dans ce cas, que détectent les études QTL ? Il paraît difficile d'imaginer qu'elles permettent de détecter des allèles qui n'ont d'effet qu'ensemble...

Alors dans quelle direction chercher ? Il faut peut-être revenir sur les résultats des études QTL, rechercher quels sont les gènes candidats à proximité de ces QTLs dans le génome de Pachon, et chercher s'ils ont un problème évident au niveau de leur séquence. Mais tant que le génome de SF est non disponible, des différences subtiles de séquences (surtout dans les régions non codantes) ne seront probablement pas détectables...

Une autre approche pourrait être de suivre pas à pas le développement du cristallin dans les 2 populations par imagerie 4D, et de déterminer quels sont les premiers défauts chez le CF. Cela pourrait donner une idée des gènes candidats potentiellement impliqués dans ces défauts.

Chez tous les autres Vertébrés cavernicoles connus, l'œil commence par se développer normalement avant de dégénérer, ce qui suggère que la formation des yeux est une contrainte développementale. La morphogenèse du cerveau, en particulier, dépendrait de la formation correcte des vésicules optiques. En revanche, le rôle particulier du cristallin ne paraît pas répandu. Le cristallin a des défauts assez précoces chez le protée, *Phreatichthys andruzzi*, le rat-taupe et le poisson-chat *Rhamdia*, mais dans tous ces cas, son rôle direct sur la dégénérescence n'a pas été montré. Chez le poisson *Sinocyclocheilus anophtalmus*, il a même été montré que la dégénérescence de la rétine était indépendante du cristallin. Il semble donc qu'au cours de l'évolution, de multiples voies conduisant à la dégénérescence de l'œil se sont mises en place dans différents lignages (Rétaux and Casane, 2013; voir introduction, partie C II a 1).

C.Bases de l'adaptation au milieu cavernicole chez *Astyanax mexicanus*

Si la perte de l'œil est une évolution intéressante, elle ne semble pas être de manière évidente adaptative, même s'il pourrait s'agir de l'effet secondaire d'une adaptation. En effet, les QTL influençant la taille de l'œil ont tous la même polarité (tendant à une diminution de la taille de l'œil chez les CF), ce qui est un indice de sélection (Protas et al., 2007). D'après les données récentes, la perte du quadrant ventral pourrait être un dommage collatéral lié à l'augmentation de la taille de l'hypothalamus (Pottin et al., 2011) et la diminution de taille du cristallin pourrait être liée à l'expansion de la placode olfactive (ce travail). En tous cas, de manière assez convaincante, la perte de l'œil semble, au moins partiellement, due aux mêmes régions du génome qui permettent l'émergence du VAB (Yoshizawa et al., 2013b). Dans ce cas, la perte de l'œil aurait été indirectement sélectionnée, car encodée par des mutations provoquant également l'apparition d'un phénotype avantageux.

La sélection indirecte est-elle donc une force d'évolution importante, qui a été sous-estimée pendant longtemps avec la théorie neutraliste, particulièrement dans le cas des « régressions » ?

Ou alors les chercheurs n'ont-ils pas un regard biaisé sur l'évolution en cherchant à tout expliquer par la sélection ? Dans le cas de l'*Astyanax*, à part le tandem VAB / perte de l'œil pour lequel les preuves sont convaincantes, le rôle de la sélection indirecte a été proposé pour l'albinisme (*Oca2* et les niveaux de dopamine (Bilandžija et al., 2013)) et la perte d'agressivité (*MAO* et les niveaux de sérotonine (Elipot et al., 2014)). Cependant, l'avantage sélectif du phénotype associé n'a été prouvé que dans le cas du VAB (Yoshizawa et al., 2010). Il est donc possible que toutes ces modifications soient neutres.

Dans le cas de la perte des yeux, il est important de noter que les études d'évolution moléculaire de ce travail ont montré une accumulation de mutations dans les gènes exprimés dans le système visuel, y compris dans les gènes de cristallines, ce qui suggère un rôle de la dérive génétique. Les deux mécanismes ne sont pas exclusifs cependant : il est tout à fait possible que certaines des mutations responsables de la perte des yeux aient été sélectionnées pour leur effet sur un autre phénotype, et que d'autres se soient accumulées par dérive génétique sur des gènes n'ayant de fonction que dans l'œil dans des conditions de sélection relâchée après changement drastique d'environnement.

Qu'est-ce qui a pu permettre l'adaptation des *Astyanax* au milieu souterrain ? L'un des problèmes majeurs dans ce milieu est la recherche de nourriture, et les modifications qui conduisent à une plus grande motivation à la recherche de nourriture, ou à une meilleure détection de celle-ci pourraient être

adaptatives. Ainsi, la perte du sommeil et de l'agressivité pourraient permettre aux CF de passer plus de temps à chercher de la nourriture. La perte de la nage en banc pourrait permettre une recherche plus efficace de la nourriture, chaque individu « scannant » le fond du bassin en nageant isolément. La motivation à la recherche de nourriture pourrait avoir été augmentée par l'expansion du noyau hypothalamique paraventriculaire antérieur (Elipot et al., 2013) et par des modifications d'expression des neuropeptides (Lucie Devos, Alexandre Alié, Lise Prunier, in prep). L'augmentation du nombre de bourgeons du goût (Yamamoto et al., 2009) et de la taille de l'épithélium olfactif (ce travail) pourrait permettre une meilleure détection de la nourriture, et la plus grande largeur des mâchoires pourrait permettre une meilleure prise alimentaire (Yamamoto et al., 2009). Pour tous ces phénotypes, la recherche des mutations causales est donc très importante (**Fig 79**). Il est à noter que la taille du PVa, le nombre de bourgeons du goût et la largeur des mâchoires sont dépendants de l'activité de Shh, dont la surexpression chez les SF provoque l'entrée en apoptose du cristallin (Elipot et al., 2013; Yamamoto et al., 2009). Mais Shh n'explique probablement que partiellement ces phénotypes, et la mutation qui conduit à l'hétérotopie de Shh n'est toujours pas connue.

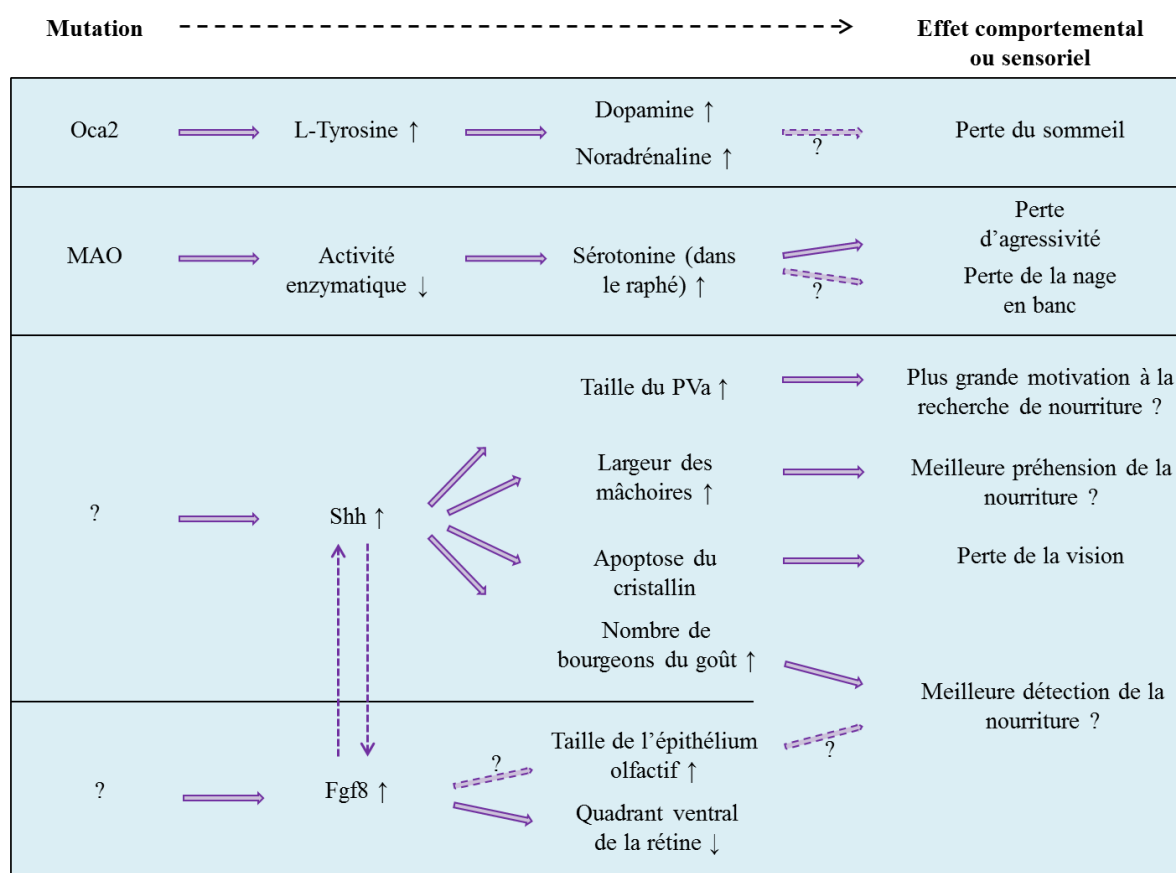


Figure 79 Mutations affectant le comportement et les modalités sensorielles chez les CF. D'après (Bilandžija et al., 2013; Elipot et al., 2013, 2014; Pottin et al., 2011; Yamamoto et al., 2004, 2009). Les flèches en pointillés indiquent des relations qui ne sont pas prouvées.

Il est à noter que dans les grottes, une partie du phénotype cavernicole doit être indépendant de la génétique. Ainsi, la plasticité développementale a sûrement un rôle très important : l'obscurité paraît influencer les capacités olfactives (Bibliowicz et al., in prep), ainsi que la rapidité de la perte de l'œil (Romero Díaz, 2009).

En combien de temps l'adaptation aux grottes a-t-elle pu se faire ? Pour répondre à cette question, il faudrait pouvoir dater l'invasion des grottes. Or, ce que mesurent les études de phylogéographie, c'est la date de la divergence entre les populations actuelles de SF et CF, qui peut être beaucoup plus ancienne. Les ancêtres des CF actuels ont en effet pu être isolés des ancêtres des SF longtemps avant d'envahir une grotte. Pour dater cette invasion, une possibilité serait de dater des modifications dans le génome liées à la vie souterraine (**Fig 80**), en s'inspirant des techniques utilisées pour dater le moment où un gène est devenu un pseudogène (Li et al., 1981; Miyata and Yasunaga, 1981).

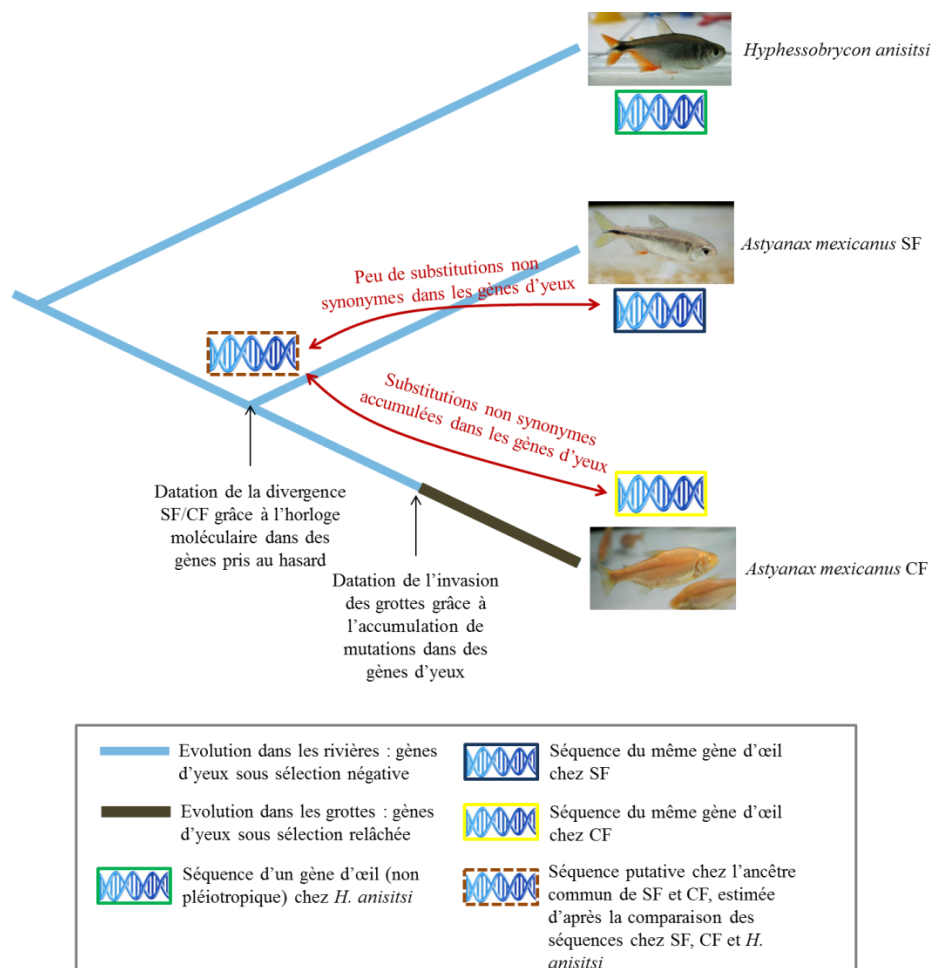


Figure 80 Principe de la datation de l'invasion des grottes par les *Astyanax* CF en s'appuyant sur l'accumulation de mutations dans des gènes d'yeux.

Par exemple, s'il est vrai que la vision n'est plus sous sélection chez les CF depuis qu'ils vivent dans les grottes, les mutations dans les gènes d'yeux non pléiotopiques devraient être « neutres » et s'accumuler, si bien que le taux de substitution dans ces gènes devrait être beaucoup plus élevé que dans les gènes toujours sous sélection. La comparaison du taux de substitutions dans des gènes sous sélection et dans des gènes d'yeux devrait permettre d'estimer la date à laquelle la sélection s'est relâchée sur les gènes d'yeux, et donc la date d'invasion des grottes. Les résultats obtenus dans cette thèse montrent que le nombre de mutations dans les cristallines, des gènes n'ayant *a priori* de fonction que dans l'œil, n'est pas très important, même s'il l'est davantage que chez les SF. En particulier, on n'observe ni délétions ni codons-stops, et la séquence de certaines cristallines de CF est même intacte. Cela suggère que l'invasion des grottes est un événement récent.

Le grand nombre de polymorphismes partagés entre SF et CF est également un indice du fait que ces 2 populations doivent avoir un ancêtre commun récent (et donc l'invasion des grottes doit être encore plus récente) (cf discussion de l'article 4).

Comment, alors, un phénotype aussi drastique que celui des CF a-t-il pu apparaître en peu de temps ? Une hypothèse vraisemblable est que les mutations provoquant l'émergence d'un phénotype cavernicole ne sont pas des mutations qui se sont produites *de novo* après l'invasion des grottes, mais plutôt des mutations qui préexistaient à faible fréquence dans la population ancestrale, ce qu'on appelle la variation génétique préexistante (Paaby and Rockman, 2014). Dans cette population ancestrale, ces différentes mutations n'auraient pas eu d'expression phénotypique, soit que leurs effets dépendent du fond génétique et de relations d'épistasie avec d'autres gènes, soit qu'ils dépendent des conditions environnementales. De ce fait, ces mutations n'auraient pas été contre-sélectionnées dans la population ancestrale. Dans les rares cas où un individu portait plusieurs mutations qui conduisaient ensemble à un effet phénotypique, ce phénotype aurait été contre-sélectionné, ce qui conduirait à maintenir ces mutations à faible fréquence dans la population.

En revanche, une fois les poissons dans les grottes, certaines mutations auraient pu s'exprimer (soit que par hasard un individu dans la grotte porte plusieurs mutations qui ensemble ont un effet phénotypique, soit que les conditions environnementales dans la grotte démasquent l'effet de certaines mutations). Alors, si le phénotype associé à ces mutations s'est révélé avantageux dans les grottes, ou en tous cas neutre, les mutations ont pu augmenter en fréquence, et conduire finalement à l'apparition du phénotype cavernicole, et ceci de manière assez rapide.

Concernant l'effet de l'environnement sur le « démasquage » de certaines mutations, un article récent propose un rôle de Hsp90, qui aurait « canalisé » la variabilité phénotypique liée à des mutations dans la population ancestrale de rivière, et dont la fonction aurait été inhibée lors de l'invasion des grottes, à cause de la faible conductivité de l'eau (Rohner et al., 2013). Cependant, cette

étude comporte des résultats contradictoires par rapport à deux autres articles plus anciens (Hooven et al., 2004; Romero and Green, 2005, voir introduction, partie C III c 4 pour une discussion détaillée). En particulier, au moment de l'entrée en apoptose du cristallin, Hsp90 n'est exprimée que dans l'œil de CF (Hooven et al., 2004), donc il paraît difficile d'imaginer que cette protéine ait un rôle canalisateur dans l'œil de SF. En revanche, la cristalline αA a un rôle de chaperonne, et est exprimée dans le cristallin des SF (Behrens, 1998; Strickler et al., 2007b) : elle pourrait donc y jouer un rôle canalisateur, qui serait perdu chez les CF.

RÉFÉRENCES

- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis, G.R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L.D., Durbin, R.M., Gibbs, R.A., Hurles, M.E., and McVean, G.A. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* **467**, 1061–1073.
- Abzhanov, A., Protas, M., Grant, B.R., Grant, P.R., and Tabin, C.J. (2004). Bmp4 and morphological variation of beaks in Darwin's finches. *Science* **305**, 1462–1465.
- Alunni, A., Menuet, A., Candal, E., Pénigault, J.-B., Jeffery, W.R., and Rétaux, S. (2007). Developmental mechanisms for retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *J. Comp. Neurol.* **505**, 221–233.
- Alvarez, J. (1946). Revision del genero *Anoptichthys* con descripcion de una especie nueva (Pisc., Characidae). *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. Mex.* **4**.
- Amemiya, C.T., Alföldi, J., Lee, A.P., Fan, S., Philippe, H., Maccallum, I., Braasch, I., Manousaki, T., Schneider, I., Rohner, N., et al. (2013). The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature* **496**, 311–316.
- Anderson, D. (1966). The comparative early embryology of the Oligochaeta, Hirudinea and Onychophora. *Proc. Linn. Soc. New South Wales* **91**, 10–43.
- Andley, U.P. (2000). Differential Protective Activity of alpha A- and alpha B-crystallin in Lens Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 36823–36831.
- Apte, D.V., Ebrey, T.G., and Dawson, M.J. (1993). Decreased energy requirement of toad retina during light adaptation as demonstrated by ³¹P nuclear magnetic resonance. *J. Physiol.* **464**, 291–306.
- Ashery-Padan, R. (2000). Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev.* **14**, 2701–2711.
- Awise, J.C., and Selander, R.K. (1972). Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of the genus *Astyanax*. *Evolution* **26**, 1–19.
- Bailey, A.P., Bhattacharyya, S., Bronner-Fraser, M., and Streit, A. (2006). Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Dev. Cell* **11**, 505–517.
- Barr, T.C. (1968). Cave ecology and the evolution of troglobites. *Evol Biol* **2**, 35–102.
- Barrick, J.E., Yu, D.S., Yoon, S.H., Jeong, H., Oh, T.K., Schneider, D., Lenski, R.E., and Kim, J.F. (2009). Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* **461**, 1243–1247.
- Barth, K.A., and Wilson, S.W. (1995). Expression of zebrafish nk2. 2 is influenced by sonic hedgehog/vertebrate hedgehog-1 and demarcates a zone of neuronal differentiation in the embryonic forebrain. *Development* **121**, 1755–1768.

- Bassnett, S., and Beebe, D.C. (1992). Coincident loss of mitochondria and nuclei during lens fiber cell differentiation. *Dev. Dyn.* 194, 85–93.
- Beebe, D.C., and Coats, J.M. (2000). The Lens Organizes the Anterior Segment: Specification of Neural Crest Cell Differentiation in the Avian Eye. *Dev. Biol.* 220, 424–431.
- Behrens, M. (1998). Cloning of the α A-crystallin genes of a blind cave form and the epigeal form of *Astyanax fasciatus*: a comparative analysis of structure, expression and evolutionary conservation. *Gene* 216, 319–326.
- Behrens, M., Langecker, T.G., Wilkens, H., and Schmale, H. (1997). Comparative analysis of Pax-6 sequence and expression in the eye development of the blind cave fish *Astyanax fasciatus* and its epigeal conspecific. *Mol. Biol. Evol.* 14, 299–308.
- Bersaglieri, T., Sabeti, P.C., Patterson, N., Vanderploeg, T., Schaffner, S.F., Drake, J.A., Rhodes, M., Reich, D.E., and Hirschhorn, J.N. (2004). Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1111–1120.
- Berti, R., Durand, J.P., Becchi, S., Brizzi, R., Keller, N., and Ruffat, G. (2001). Eye degeneration in the blind cave-dwelling fish *Phreatichthys andruzzii*. *Can. J. Zool.* 79, 1278–1285.
- Bibliowicz, J., Alié, A., Espinasa, L., Yoshizawa, M., Blin, M., Hinaux, H., Legendre, L., Père, S., and Rétaux, S. (2013). Differences in chemosensory response between eyed and eyeless *Astyanax mexicanus* of the Rio Subterráneo cave. *EvoDevo* 4, 25.
- Bilandžija, H., Četković, H., and Jeffery, W.R. (2012). Evolution of albinism in cave planthoppers by a convergent defect in the first step of melanin biosynthesis. *Evol. Dev.* 14, 196–203.
- Bilandžija, H., Ma, L., Parkhurst, A., and Jeffery, W.R. (2013). A Potential Benefit of Albinism in *Astyanax* Cavefish: Downregulation of the *oca2* Gene Increases Tyrosine and Catecholamine Levels as an Alternative to Melanin Synthesis. *PloS One* 8, e80823.
- Blixt, A., Landgren, H., Johansson, B.R., and Carlsson, P. (2007). *Foxe3* is required for morphogenesis and differentiation of the anterior segment of the eye and is sensitive to Pax6 gene dosage. *Dev. Biol.* 302, 218–229.
- De Bono, M., and Bargmann, C.I. (1998). Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behavior and food response in *C. elegans*. *Cell* 94, 679–689.
- Borowsky, R. (2008). Restoring sight in blind cavefish. *Curr. Biol.* 18, R23–R24.
- Borowsky, R. (2013). Eye regression in blind *Astyanax* cavefish may facilitate the evolution of an adaptive behavior and its sensory receptors. *BMC Biol.* 11, 81.
- Borowsky, R., and Cohen, D. (2013). Genomic consequences of ecological speciation in *astyanax* cavefish. *PloS One* 8, e79903.
- Borowsky, R., and Wilkens, H. (2002). Mapping a cave fish genome: polygenic systems and regressive evolution. *J. Hered.* 93, 19.
- Boudriot, F., and Reutter, K. (2001). Ultrastructure of the taste buds in the blind cave fish *Astyanax jordani* (“*Anoptichthys*”) and the sighted river fish *Astyanax mexicanus* (Teleostei, Characidae). *J. Comp. Neurol.* 434, 428–444.

- Bradic, M., Beerli, P., García-de León, F.J., Esquivel-Bobadilla, S., and Borowsky, R.L. (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evol. Biol.* 12, 9.
- Bradic, M., Teotónio, H., and Borowsky, R.L. (2013). The population genomics of repeated evolution in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *Mol. Biol. Evol.*
- Breitman, M.L., Clapoff, S., Rossant, J., Tsui, L.-C., Glode, L.M., Maxwell, I.H., and Bernstein, A. (1987). Genetic ablation: targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice. *Science* 238, 1563–1565.
- Breitman, M.L., Bryce, D.M., Giddens, E., Clapoff, S., Goring, D., Tsui, L.C., Klintworth, G.K., and Bernstein, A. (1989). Analysis of lens cell fate and eye morphogenesis in transgenic mice ablated for cells of the lens lineage. *Dev. Camb. Engl.* 106, 457–463.
- Breitman, M.L., Rombola, H., Maxwell, I.H., Klintworth, G.K., and Bernstein, A. (1990). Genetic ablation in transgenic mice with an attenuated diphtheria toxin A gene. *Mol. Cell. Biol.* 10, 474–479.
- Briggs, J.C. (2005). The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. *J. Biogeogr.* 32, 287–294.
- Buffenstein, R., and Jarvis, J.U.M. (2002). The naked mole rat--a new record for the oldest living rodent. *Sci. Aging Knowl. Environ. SAGE KE* 2002, pe7.
- Cahn, P.H. (1958). Comparative optic development in *Astyanax mexicanus* and in two of its blind derivatives.
- Carroll, S.B. (2008). *Evo-Devo and an Expanding Evolutionary Synthesis: A Genetic Theory of Morphological Evolution*. *Cell* 134, 25–36.
- Cather, J.N. (1974). *Embryology and phylogeny in annelids and arthropods*. Pergamon, New York. 1973. \$24. 495 pp. International Series of Monographs in Pure and Applied Biology. Zoology Division. Vol. 50.
- Chan, Y.F., Marks, M.E., Jones, F.C., Villarreal, G., Jr, Shapiro, M.D., Brady, S.D., Southwick, A.M., Absher, D.M., Grimwood, J., Schmutz, J., et al. (2010). Adaptive evolution of pelvic reduction in sticklebacks by recurrent deletion of a *Pitx1* enhancer. *Science* 327, 302–305.
- Chauhan, B.K., Zhang, W., Cveklova, K., Kantorow, M., and Cvekl, A. (2002). Identification of differentially expressed genes in mouse *Pax6* heterozygous lenses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 1884–1890.
- Chen, J.-Y., Chang, B.-E., Chen, Y.-H., Lin, C.J.-F., Wu, J.-L., and Kuo, C.-M. (2001). Molecular Cloning, Developmental Expression, and Hormonal Regulation of Zebrafish (*Danio rerio*) β Crystallin B1, a Member of the Superfamily of β Crystallin Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 105–110.
- Cohen, D.M., and McCosker, J.E. (1998). A new species of bythitid fish, genus *Lucifuga*, from the Galápagos Islands. *Bull. Mar. Sci.* 63, 179–187.
- Coulombre, A.J., and Coulombre, J.L. (1964). LENS DEVELOPMENT. I. ROLE OF THE LENS IN EYE GROWTH. *J. Exp. Zool.* 156, 39–47.

- Coulombre, J.L., and Coulombre, A.J. (1963). LENS DEVELOPMENT: FIBER ELONGATION AND LENS ORIENTATION. *Science* 142, 1489–1490.
- Crish, S.D., Rice, F.L., Park, T.J., and Comer, C.M. (2003). Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats I: vibrissa-like body hairs comprise a sensory array that mediates orientation to tactile stimuli. *Brain. Behav. Evol.* 62, 141–151.
- Crish, S.D., Dengler-Crish, C.M., and Catania, K.C. (2006). Central visual system of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 288, 205–212.
- Culver, D.C. (1995). *Adaptation and natural selection in caves: the evolution of Gammarus minus* (Cambridge, Mass: Harvard University Press).
- Cvekl, A., and Duncan, M.K. (2007). Genetic and epigenetic mechanisms of gene regulation during lens development. *Prog. Retin. Eye Res.* 26, 555–597.
- Dahm, R., Schonthaler, H.B., Soehn, A.S., van Marle, J., and Vrensen, G.F.J.M. (2007). Development and adult morphology of the eye lens in the zebrafish. *Exp. Eye Res.* 85, 74–89.
- Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life.* (John Murray).
- Derkarabetian, S., Steinmann, D.B., and Hedin, M. (2010). Repeated and Time-Correlated Morphological Convergence in Cave-Dwelling Harvestmen (Opiliones, Laniatores) from Montane Western North America. *PLoS ONE* 5, e10388.
- Desutter-Grandcolas, L. (1997). Studies in cave life evolution: a rationale for future theoretical developments using phylogenetic inference. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 35, 23–32.
- Dowling, T.E., Martasian, D.P., and Jeffery, W.R. (2002). Evidence for multiple genetic forms with similar eyeless phenotypes in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Mol. Biol. Evol.* 19, 446–455.
- Duboué, E.R., Keene, A.C., and Borowsky, R.L. (2011). Evolutionary Convergence on Sleep Loss in Cavefish Populations. *Curr. Biol.* 21, 671–676.
- Duboué, E.R., Borowsky, R.L., and Keene, A.C. (2012). β -adrenergic signaling regulates evolutionarily derived sleep loss in the Mexican cavefish. *Brain. Behav. Evol.* 80, 233–243.
- Duboule, D., and Dollé, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* 8, 1497–1505.
- Durand, J.P. (1976). Ocular development and involution in the European cave salamander, *Proteus anguinus laurenti*. *Biol. Bull.* 151, 450–466.
- Durand, J., Keller, N., Renard, G., Thorn, R., and Pouliquen, Y. (1993). Residual cornea and the degenerate eye of the cryptophthalmic *Typhlotriton spelaeus*. *Cornea* 12, 437–447.
- Dutta, S., Dietrich, J.E., Aspöck, G., Burdine, R.D., Schier, A., Westerfield, M., and Varga, Z.M. (2005). *pitx3* defines an equivalence domain for lens and anterior pituitary placode. *Development* 132, 1579.
- Eguchi, G., Eguchi, Y., Nakamura, K., Yadav, M.C., Millán, J.L., and Tsonis, P.A. (2011). Regenerative capacity in newts is not altered by repeated regeneration and ageing. *Nat. Commun.* 2, 384.

- Eizirik, E., Yuhki, N., Johnson, W.E., Menotti-Raymond, M., Hannah, S.S., and O'Brien, S.J. (2003). Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Curr. Biol.* **13**, 448–453.
- Elipot, Y., Legendre, L., Père, S., Sohm, F., and Rétaux, S. (submitted). *Astyanax* transgenesis and husbandry: how cavefish enters the lab. *Zebrafish*.
- Elipot, Y., Hinaux, H., Callebert, J., and Rétaux, S. (2013). Evolutionary Shift from Fighting to Foraging in Blind Cavefish through Changes in the Serotonin Network. *Curr. Biol.* **23**, 1–10.
- Elipot, Y., Hinaux, H., Callebert, J., Launay, J.-M., Blin, M., and Rétaux, S. (2014). A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax* cavefish behavioural syndrome. *Nat. Commun.* **5**.
- Emlen, D.J. (2001). Costs and the diversification of exaggerated animal structures. *Science* **291**, 1534–1536.
- England, S.J., Blanchard, G.B., Mahadevan, L., and Adams, R.J. (2006). A dynamic fate map of the forebrain shows how vertebrate eyes form and explains two causes of cyclopia. *Development* **133**, 4613–4617.
- Eshom, M., Darwood, A., and O'Leary, J. FOROS ACUARIOFILIA TOTAL - Índice.
- Espinasa, L., Rivas-Manzano, P., and Perez, H.E. (2001). A new blind cave fish population of genus *Astyanax*: geography, morphology and behavior. *Environ. Biol. Fishes* **62**, 339–344.
- Eveleigh, P. (2000). *Primula World*, A visual reference for the genus *Primula*.
- Fagerholm, P.P., Philipson, B.T., and Lindström, B. (1981). Normal human lens—the distribution of protein. *Exp. Eye Res.* **33**, 615–620.
- Fondon, J.W., and Garner, H.R. (2004). Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 18058–18063.
- Friedrich, M., Chen, R., Daines, B., Bao, R., Caravas, J., Rai, P.K., Zgamaister, M., and Peck, S.B. (2011). Phototransduction and clock gene expression in the troglolobiont beetle *Ptomaphagus hirtus* of Mammoth cave. *J. Exp. Biol.* **214**, 3532–3541.
- Garfield, D.A., and Wray, G.A. (2009). Comparative embryology without a microscope: using genomic approaches to understand the evolution of development. *J. Biol.* **8**, 65.
- Gestri, G., Link, B.A., and Neuhauss, S.C.F. (2012). The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases. *Dev. Neurobiol.* **72**, 302–327.
- Del Giacco, L., Pistocchi, A., and Ghilardi, A. (2010). *prox1b* Activity is essential in zebrafish lymphangiogenesis. *PLoS One* **5**, e13170.
- Gibert, J.-M., Marcellini, S., David, J.R., Schlötterer, C., and Simpson, P. (2005). A major bristle QTL from a selected population of *Drosophila* uncovers the zinc-finger transcription factor *poils-au-dos*, a repressor of *achaete-scute*. *Dev. Biol.* **288**, 194–205.
- Glasgow, E., and Tomarev, S.I. (1998). Restricted expression of the homeobox gene *prox 1* in developing zebrafish. *Mech. Dev.* **76**, 175–178.

- Goishi, K. (2006). A-crystallin expression prevents γ -crystallin insolubility and cataract formation in the zebrafish cloche mutant lens. *Development* 133, 2585–2593.
- Gompel, N., Prud'homme, B., Wittkopp, P.J., Kassner, V.A., and Carroll, S.B. (2005). Chance caught on the wing: cis-regulatory evolution and the origin of pigment patterns in *Drosophila*. *Nature* 433, 481–487.
- Grainger, R.M., Mannion, J.E., Cook, T.L., Jr, and Zygar, C.A. (1997). Defining intermediate stages in cell determination: acquisition of a lens-forming bias in head ectoderm during lens determination. *Dev. Genet.* 20, 246–257.
- Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., and Brand, M. (2006). Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev. Biol.* 295, 263–277.
- Graw, J. (2010). Eye Development. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Elsevier), pp. 343–386.
- Greiling, T.M.S., and Clark, J.I. (2009). Early lens development in the zebrafish: A three-dimensional time-lapse analysis. *Dev. Dyn.* 238, 2254–2265.
- Greiling, T.M.S., and Clark, J.I. (2012). New Insights into the Mechanism of Lens Development Using Zebra Fish. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 1–61.
- Greiling, T.M., Houck, S.A., and Clark, J.I. (2009). The zebrafish lens proteome during development and aging. *Mol. Vis.* 15, 2313.
- Greiling, T.M.S., Aose, M., and Clark, J.I. (2010). Cell fate and differentiation of the developing ocular lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 1540–1546.
- Griffiths, A.J., Gelbart, W.M., Miller, J.H., and Lewontin, R.C. (2002). *Modern genetic analysis* (New York : W.H. Freeman, c1999).
- Grimm, C., Chatterjee, B., Favor, J., Immervoll, T., Löster, J., Klopp, N., Sandulache, R., and Graw, J. (1998). Aphakia (ak), a mouse mutation affecting early eye development: fine mapping, consideration of candidate genes and altered Pax6 and Six3 gene expression pattern. *Dev. Genet.* 23, 299–316.
- Grocott, T., Tambalo, M., and Streit, A. (2012). The peripheral sensory nervous system in the vertebrate head: a gene regulatory perspective. *Dev. Biol.* 370, 3–23.
- Gross, J.B. (2012). The complex origin of *Astyanax* cavefish. *BMC Evol. Biol.* 12, 105.
- Gross, J.B., and Wilkens, H. (2013). Albinism in phylogenetically and geographically distinct populations of *Astyanax* cavefish arises through the same loss-of-function Oca2 allele. *Heredity* 111, 122–130.
- Gross, J.B., Protas, M., Conrad, M., Scheid, P.E., Vidal, O., Jeffery, W.R., Borowsky, R., and Tabin, C.J. (2008). Synteny and candidate gene prediction using an anchored linkage map of *Astyanax mexicanus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 20106.

- Gross, J.B., Borowsky, R., and Tabin, C.J. (2009). A novel role for Mc1r in the parallel evolution of depigmentation in independent populations of the cavefish *Astyanax mexicanus*. *PLoS Genet.* 5, e1000326.
- Gross, J.B., Furterer, A., Carlson, B.M., and Stahl, B.A. (2013). An Integrated Transcriptome-Wide Analysis of Cave and Surface Dwelling *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE* 8, e55659.
- Grove, E.A. (2008). Turning neurons into a nervous system. *Development* 135, 2203–2206.
- Guerreiro, I., Nunes, A., Woltering, J.M., Casaca, A., Nóvoa, A., Vinagre, T., Hunter, M.E., Duboule, D., and Mallo, M. (2013). Role of a polymorphism in a Hox/Pax-responsive enhancer in the evolution of the vertebrate spine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 10682–10686.
- Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W.J. (1995). New perspectives on eye evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 602–609.
- Hansen, A., Reutter, K., and Zeiske, E. (2002). Taste bud development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Dyn.* 223, 483–496.
- Harding, R.L., Howley, S., Baker, L.J., Murphy, T.R., Archer, W.E., Wistow, G., Hyde, D.R., and Vihtelic, T.S. (2008). Lengsin expression and function during zebrafish lens formation. *Exp. Eye Res.* 86, 807–818.
- Hausdorf, B., Wilkens, H., and Strecker, U. (2011). Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Mol. Phylogenet. Evol.* 60, 89–97.
- Hedrick, P.W. (2011). Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity* 107, 283–304.
- Helfman, G.S. (2009). *The diversity of fishes* (Oxford: Wiley-Blackwell).
- Hendriks, W., Leunissen, J., Nevo, E., Bloemendal, H., and de Jong, W.W. (1987). The lens protein alpha A-crystallin of the blind mole rat, *Spalax ehrenbergi*: evolutionary change and functional constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 5320–5324.
- Hervant, F., Mathieu, J., and Durand, J. (2001). Behavioural, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in a blind cave-dwelling (*Proteus anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander. *J. Exp. Biol.* 204, 269–281.
- Hill, A.W., Guralnick, R.P., Wilson, M.J.C., Habib, F., and Janies, D. (2009). Evolution of drug resistance in multiple distinct lineages of H5N1 avian influenza. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 9, 169–178.
- Hinaux, H., Pottin, K., Chalhoub, H., Père, S., Elipot, Y., Legendre, L., and Rétaux, S. (2011). A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachón cavefish. *Zebrafish* 8, 155–165.
- Hinaux, H., Poulain, J., Da Silva, C., Noirot, C., Jeffery, W.R., Casane, D., and Rétaux, S. (2013). De Novo Sequencing of *Astyanax mexicanus* Surface Fish and Pachón Cavefish Transcriptomes Reveals Enrichment of Mutations in Cavefish Putative Eye Genes. *PLoS ONE* 8, e53553.
- Hooker, L., Smoczer, C., KhosrowShahian, F., Wolanski, M., and Crawford, M.J. (2012). Microarray-based identification of Pitx3 targets during *Xenopus* embryogenesis. *Dev. Dyn.* 241, 1487–1505.

- Hooven, T.A., Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2004). Blind cavefish and heat shock protein chaperones: a novel role for hsp90alpha in lens apoptosis. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 731–738.
- Hopwood, N. (2011). Approaches and species in the history of vertebrate embryology. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **770**, 1–20.
- Horder, T.J. (2006). Gavin Rylands de Beer: how embryology foreshadowed the dilemmas of the genome. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 892–898.
- Hubbs, C.L., and Innes, W.T. (1936). The first known blind fish of the family Characidae: a new genus from Mexico.
- Von Humboldt, A. (1805). Quatrième mémoire, sur une nouvelle espèce de pimelode, jetée par les volcans du royaume de Quito (F. Schoell).
- Hüppop, K. (1987). Food-finding ability in cave fish (*Astyanax fasciatus*). *Int. J. Speleol.* **16**, 59–66.
- Hüppop, K. (1988). Phänomene und Bedeutung der Energieersparnis bei dem Höhlenfisch *Astyanax fasciatus* (Characidae). Hamburg.
- Hüppop, K., and Wilkens, H. (1991). Bigger eggs in subterranean *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **29**, 280–288.
- Hyatt, G.A., Schmitt, E.A., Marsh-Armstrong, N., McCaffery, P., Drager, U.C., and Dowling, J.E. (1996). Retinoic acid establishes ventral retinal characteristics. *Development* **122**, 195–204.
- Irie, N., and Kuratani, S. (2011). Comparative transcriptome analysis reveals vertebrate phylotypic period during organogenesis. *Nat. Commun.* **2**, 248.
- Ishibashi, S., and Yasuda, K. (2001). Distinct roles of *maf* genes during *Xenopus* lens development. *Mech. Dev.* **101**, 155–166.
- Issartel, J., Hervant, F., de Fraipont, M., Clobert, J., and Voituron, Y. (2009). High anoxia tolerance in the subterranean salamander *Proteus anguinus* without oxidative stress nor activation of antioxidant defenses during reoxygenation. *J. Comp. Physiol. [B]* **179**, 543–551.
- Javonillo, R., Malabarba, L.R., Weitzman, S.H., and Burns, J.R. (2010). Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* **54**, 498–511.
- Jeffery, W.R. (2003). To See or Not to See: Evolution of Eye Degeneration in Mexican Blind Cavefish. *Integr. Comp. Biol.* **43**, 531–541.
- Jeffery, W.R. (2009). Regressive Evolution in *Astyanax* Cavefish. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 25–47.
- Jeffery, W.R., and Martasian, D.P. (1998). Evolution of Eye Regression in the Cavefish *Astyanax* : Apoptosis and the *Pax-6* Gene. *Integr. Comp. Biol.* **38**, 685–696.
- Jeffery, W., Strickler, A., Guiney, S., Heyser, D., and Tomarev, S. (2000). Prox 1 in eye degeneration and sensory organ compensation during development and evolution of the cavefish *Astyanax*. *Dev. Genes Evol.* **210**, 223–230.

- Jones, F.C., Grabherr, M.G., Chan, Y.F., Russell, P., Mauceli, E., Johnson, J., Swofford, R., Pirun, M., Zody, M.C., White, S., et al. (2012). The genomic basis of adaptive evolution in threespine sticklebacks. *Nature* 484, 55–61.
- De Jong, W.W., Leunissen, J.A., and Voorter, C.E. (1993). Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol. Biol. Evol.* 10, 103–126.
- Kajihara, M., Kawauchi, S., Kobayashi, M., Ogino, H., Takahashi, S., and Yasuda, K. (2001). Isolation, characterization, and expression analysis of zebrafish large Mafs. *J. Biochem. (Tokyo)* 129, 139–146.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Dev. Camb. Engl.* 125, 2521–2532.
- Kim, E.B., Fang, X., Fushan, A.A., Huang, Z., Lobanov, A.V., Han, L., Marino, S.M., Sun, X., Turanov, A.A., Yang, P., et al. (2011). Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature* 479, 223–227.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 203, 253–310.
- Kimura, M. (1991). The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Idengaku Zasshi* 66, 367–386.
- Klaus, S., Mendoza, J.C.E., Liew, J.H., Plath, M., Meier, R., and Yeo, D.C.J. (2013). Rapid evolution of troglomorphic characters suggests selection rather than neutral mutation as a driver of eye reduction in cave crabs. *Biol. Lett.* 9, 20121098–20121098.
- Kondoh, H., Uchikawa, M., Yoda, H., Takeda, H., Furutani-Seiki, M., and Karlstrom, R.O. (2000). Zebrafish mutations in Gli-mediated hedgehog signaling lead to lens transdifferentiation from the adeno-hypophysis anlage. *Mech. Dev.* 96, 165–174.
- Kondoh, H., Uchikawa, M., and Kamachi, Y. (2004). Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 819–827.
- Kos, M., Bulog, B., Szél, A., and Röhlich, P. (2001). Immunocytochemical demonstration of visual pigments in the degenerate retinal and pineal photoreceptors of the blind cave salamander (*Proteus anguinus*). *Cell Tissue Res.* 303, 15–25.
- Kowalko, J.E., Rohner, N., Linden, T.A., Rompani, S.B., Warren, W.C., Borowsky, R., Tabin, C.J., Jeffery, W.R., and Yoshizawa, M. (2013a). Convergence in feeding posture occurs through different genetic loci in independently evolved cave populations of *Astyanax mexicanus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Kowalko, J.E., Rohner, N., Rompani, S.B., Peterson, B.K., Linden, T.A., Yoshizawa, M., Kay, E.H., Weber, J., Hoekstra, H.E., Jeffery, W.R., et al. (2013b). Loss of Schooling Behavior in Cavefish through Sight-Dependent and Sight-Independent Mechanisms. *Curr. Biol.*
- Kryazhimskiy, S., and Plotkin, J.B. (2008). The population genetics of dN/dS. *PLoS Genet.* 4, e1000304.
- Kurita, R., Sagara, H., Aoki, Y., Link, B.A., Arai, K., and Watanabe, S. (2003). Suppression of lens growth by α A-crystallin promoter-driven expression of diphtheria toxin results in disruption of retinal cell organization in zebrafish. *Dev. Biol.* 255, 113–127.

- Kwan, K.M., Otsuna, H., Kidokoro, H., Carney, K.R., Saijoh, Y., and Chien, C.-B. (2011). A complex choreography of cell movements shapes the vertebrate eye. *Development* 139, 359–372.
- Land, M.F., and Nilsson, D.-E. (2002). *Animal eyes*.
- Landel, C.P., Zhao, J., Bok, D., and Evans, G.A. (1988). Lens-specific expression of recombinant ricin induces developmental defects in the eyes of transgenic mice. *Genes Dev.* 2, 1168–1178.
- Langecker, T.G., Schmale, H., and Wilkens, H. (1993). Transcription of the opsin gene in degenerate eyes of cave-dwelling *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) and of its conspecific epigeal ancestor during early ontogeny. *Cell Tissue Res.* 273, 183–192.
- Langecker, T.G., Wilkens, H., and Schmale, H. (1995). Developmental constraints in regressive evolution: studies of the expression of the γ s-crystallin gene in the developing lens of cave-dwelling *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) (Teleostei, Characidae) by in situ hybridization. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 33, 123–128.
- Lappin, T.R.J., Grier, D.G., Thompson, A., and Halliday, H.L. (2006). HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med. J.* 75, 23–31.
- Li, H.S., Yang, J.M., Jacobson, R.D., Pasko, D., and Sundin, O. (1994). Pax-6 is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: implications for stepwise determination of the lens. *Dev. Biol.* 162, 181–194.
- Li, W.-H., Gojobori, T., and Nei, M. (1981). Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature* 292, 237–239.
- Li, Z., Joseph, N.M., and Easter, S.S. (2000). The morphogenesis of the zebrafish eye, including a fate map of the optic vesicle. *Dev. Dyn.* 218, 175–188.
- Lindblad-Toh, K., Garber, M., Zuk, O., Lin, M.F., Parker, B.J., Washietl, S., Kheradpour, P., Ernst, J., Jordan, G., Mauceli, E., et al. (2011). A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. *Nature* 478, 476–482.
- Litt, M. (1998). Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. *Hum. Mol. Genet.* 7, 471–474.
- Lledo, P.-M., and Gheusi, G. (2003). Olfactory processing in a changing brain. *Neuroreport* 14, 1655–1663.
- Lledo, P.-M., Saghatelian, A., and Lemasson, M. (2004). Inhibitory interneurons in the olfactory bulb: from development to function. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 10, 292–303.
- Lleras-Forero, L., Tambalo, M., Christophorou, N., Chambers, D., Houart, C., and Streit, A. (2013). Neuropeptides: Developmental Signals in Placode Progenitor Formation. *Dev. Cell* 26, 195–203.
- Loiseau, C., Richard, M., Garnier, S., Chastel, O., Julliard, R., Zoorob, R., and Sorci, G. (2009). Diversifying selection on MHC class I in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Mol. Ecol.* 18, 1331–1340.
- Loosli, F., Staub, W., Finger-Baier, K.C., Ober, E.A., Verkade, H., Wittbrodt, J., and Baier, H. (2003). Loss of eyes in zebrafish caused by mutation of *chokh/rx3*. *EMBO Rep.* 4, 894–899.

- Love, A.C., and Raff, R.A. (2003). Knowing your ancestors: themes in the history of evo-devo. *Evol. Dev.* 5, 327–330.
- Lovicu, F.J., and McAvoy, J.W. (2005). Growth factor regulation of lens development. *Dev. Biol.* 280, 1–14.
- Lovicu, F.J., Chamberlain, C.G., and McAvoy, J.W. (1995). Differential effects of aqueous and vitreous on fiber differentiation and extracellular matrix accumulation in lens epithelial explants. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 1459–1469.
- Mackay, D.S., Andley, U.P., and Shiels, A. (2003). Cell death triggered by a novel mutation in the alphaA-crystallin gene underlies autosomal dominant cataract linked to chromosome 21q. *Eur. J. Hum. Genet.* 11, 784–793.
- Mahler, B., Chen, Y., Ford, J., Thiel, C., Wistow, G., and Wu, Z. (2013). Structure and Dynamics of the Fish Eye Lens Protein, γ M7-Crystallin. *Biochemistry (Mosc.)* 52, 3579–3587.
- Mansfield, J.H. (2013). cis-regulatory change associated with snake body plan evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 10473–10474.
- Marvin, M., O'Rourke, D., Kurihara, T., Juliano, C.E., Harrison, K.L., and Hutson, L.D. (2008). Developmental expression patterns of the zebrafish small heat shock proteins. *Dev. Dyn.* 237, 454–463.
- McGaugh, S., Warren, W.C., Minx, P., Gross, J.B., Tabin, C., Rohner, N., Chalopin, D., Yoshizawa, M., Keene, A.C., Jeffery, W.R., et al. (in prep.). *Astyanax mexicanus* cavefish genome.
- McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, A., and Gehring, W.J. (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403–408.
- Medina-Martinez, O., Brownell, I., Amaya-Manzanares, F., Hu, Q., Behringer, R.R., and Jamrich, M. (2005). Severe Defects in Proliferation and Differentiation of Lens Cells in Foxe3 Null Mice. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8854–8863.
- Menuet, A., Alunni, A., Joly, J.-S., Jeffery, W.R., and Retaux, S. (2007). Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development* 134, 845–855.
- Mitchell, R.W., Russell, W.H., and Elliott, W.R. (1977). Mexican Eyeless Characin Fishes, Genus *Astyanax*: Environment, Distribution, and Evolution (Lubbock: Texas Press).
- Miyata, T., and Yasunaga, T. (1981). Rapidly evolving mouse alpha-globin-related pseudo gene and its evolutionary history. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 450–453.
- Moens, C.B., Cordes, S.P., Giorgianni, M.W., Barsh, G.S., and Kimmel, C.B. (1998). Equivalence in the genetic control of hindbrain segmentation in fish and mouse. *Development* 125, 381–391.
- Montgomery, J., Coombs, S., and Halstead, M. (1995). Biology of the mechanosensory lateral line in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 5, 399–416.
- Moorman, S.J. (2001). Development of Sensory Systems in Zebrafish (*Donio rerio*). *ILAR J.* 42, 292–298.

- Nakatani, M., Miya, M., Mabuchi, K., Saitoh, K., and Nishida, M. (2011). Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeen origin and Mesozoic radiation. *BMC Evol. Biol.* 11, 177.
- Near, T.J., Eytan, R.I., Dornburg, A., Kuhn, K.L., Moore, J.A., Davis, M.P., Wainwright, P.C., Friedman, M., and Smith, W.L. (2012). Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13698–13703.
- Nechiporuk, A., Linbo, T., Poss, K.D., and Raible, D.W. (2007). Specification of epibranchial placodes in zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* 134, 611–623.
- Niemiller, M.L., Fitzpatrick, B.M., Shah, P., Schmitz, L., and Near, T.J. (2013). Evidence for repeated loss of selective constraint in rhodopsin of amblyopsid cavefishes (Teleostei: Amblyopsidae). *Evol. Int. J. Org. Evol.* 67, 732–748.
- Nikaido, M., Noguchi, H., Nishihara, H., Toyoda, A., Suzuki, Y., Kajitani, R., Suzuki, H., Okuno, M., Aibara, M., Ngatunga, B.P., et al. (2013). Coelacanth genomes reveal signatures for evolutionary transition from water to land. *Genome Res.* 23, 1740–1748.
- Nikitina, N.V., Maughan-Brown, B., O’Riain, M.J., and Kidson, S.H. (2004). Postnatal development of the eye in the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*). *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 277, 317–337.
- O’Quin, K.E., Yoshizawa, M., Doshi, P., and Jeffery, W.R. (2013). Quantitative Genetic Analysis of Retinal Degeneration in the Blind Cavefish *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE* 8, e57281.
- Ohta, T. (1992). The Nearly Neutral Theory of Molecular Evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23, 263–286.
- Okawa, H., Sampath, A.P., Laughlin, S.B., and Fain, G.L. (2008). ATP consumption by mammalian rod photoreceptors in darkness and in light. *Curr. Biol. CB* 18, 1917–1921.
- Olsson, L., Levit, G.S., and Hossfeld, U. (2010). Evolutionary developmental biology: its concepts and history with a focus on Russian and German contributions. *Naturwissenschaften* 97, 951–969.
- Ornelas-García, C.P., Domínguez-Domínguez, O., and Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evol. Biol.* 8, 340.
- Paaby, A.B., and Rockman, M.V. (2014). Cryptic genetic variation: evolution’s hidden substrate. *Nat. Rev. Genet.* 15, 247–258.
- Panafieu, J.-B. de (2007). *Évolution* (Paris: Éditions X. Barral : Muséum national d’histoire naturelle).
- Pansky, B. (1982). *Review of medical embryology* (New York: Macmillan).
- Parichy, D.M., Elizondo, M.R., Mills, M.G., Gordon, T.N., and Engeszer, R.E. (2009). Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev. Dyn.* 238, 2975–3015.
- Du Pasquier, D., Chesneau, A., Ymlahi-Ouazzani, Q., Boistel, R., Pollet, N., Ballagny, C., Sachs, L.M., Demeneix, B., and Mazabraud, A. (2007). tBid mediated activation of the mitochondrial death pathway leads to genetic ablation of the lens in *Xenopus laevis*. *Genes. N. Y. N* 2000 45, 1–10.

- Peng, Z., He, S., Wang, J., Wang, W., and Diogo, R. (2006). Mitochondrial molecular clocks and the origin of the major Otocephalan clades (Pisces: Teleostei): A new insight. *Gene* 370, 113–124.
- Piatigorsky, J. (2003). Gene sharing, lens crystallins and speculations on an eye/ear evolutionary relationship. *Integr. Comp. Biol.* 43, 492–499.
- Popper, A.N. (1970). Auditory capacities of the Mexican blind cave fish (*Astyanax jordani*) and its eyed ancestor (*Astyanax mexicanus*). *Anim. Behav.* 18, 552–562.
- Porter, M.L., and Crandall, K.A. (2003). Lost along the way: the significance of evolution in reverse. *Trends Ecol. Evol.* 18, 541–547.
- Porter, M.L., Dittmar, K., and Pérez-Losada, M. (2007). How long does evolution of the troglomorphic form take? Estimating divergence times in (*Astyanax Mexicanus*).
- Posner, M., Kantorow, M., and Horwitz, J. (1999). Cloning, sequencing and differential expression of alphaB-crystallin in the zebrafish, *Danio rerio*. *Biochim. Biophys. Acta* 1447, 271–277.
- Posner, M., Hawke, M., LaCava, C., Prince, C.J., Bellanco, N.R., and Corbin, R.W. (2008). A proteome map of the zebrafish (*Danio rerio*) lens reveals similarities between zebrafish and mammalian crystallin expression. *Mol. Vis.* 14, 806.
- Posner, M., Skiba, J., Brown, M., Liang, J.O., Nussbaum, J., and Prior, H. (2013). Loss of the small heat shock protein α A-crystallin does not lead to detectable defects in early zebrafish lens development. *Exp. Eye Res.* 116, 227–233.
- Pottin, K., Hinaux, H., and Retaux, S. (2011). Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* 138, 2467–2476.
- Pressac, J.-B. Station d'Ecologie Expérimentale du CNRS à Moulis - GUILLAUME Olivier.
- Protas, M., and Jeffery, W.R. (2012). Evolution and development in cave animals: from fish to crustaceans. *WIREs Dev Biol* 1, 823–845.
- Protas, M., Conrad, M., Gross, J.B., Tabin, C., and Borowsky, R. (2007). Regressive evolution in the Mexican cave tetra, *Astyanax mexicanus*. *Curr. Biol.* 17, 452–454.
- Protas, M., Tabansky, I., Conrad, M., Gross, J.B., Vidal, O., Tabin, C.J., and Borowsky, R. (2008). Multi-trait evolution in a cave fish, *Astyanax mexicanus*. *Evol. Dev.* 10, 196–209.
- Protas, M.E., Hersey, C., Kochanek, D., Zhou, Y., Wilkens, H., Jeffery, W.R., Zon, L.I., Borowsky, R., and Tabin, C.J. (2005). Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nat. Genet.* 38, 107–111.
- Protas, M.E., Trontelj, P., and Patel, N.H. (2011). Genetic basis of eye and pigment loss in the cave crustacean, *Asellus aquaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5702–5707.
- Raymond, S.M., and Jackson, I.J. (1995). The retinal pigmented epithelium is required for development and maintenance of the mouse neural retina. *Curr. Biol. CB* 5, 1286–1295.
- Relethford, J.H., and Crawford, M.H. (2013). Genetic drift and the population history of the Irish travellers. *Am. J. Phys. Anthropol.* 150, 184–189.

- Rétaux, S., and Casane, D. (2013). Evolution of eye development in the darkness of caves: adaptation, drift, or both? *EvoDevo* 4, 26.
- Rétaux, S., Bourrat, F., Joly, J.-S., and Hinaux, H. (2013). Perspectives in Evo-Devo of the Vertebrate Brain. *Adv. Evol. Dev. Biol.* 151–172.
- Riesch, R., Schlupp, I., Langerhans, R.B., and Plath, M. (2011a). Shared and unique patterns of embryo development in extremophile poeciliids. *PloS One* 6, e27377.
- Riesch, R., Plath, M., and Schlupp, I. (2011b). Speciation in caves: experimental evidence that permanent darkness promotes reproductive isolation. *Biol. Lett.* 7, 909–912.
- Rohner, N., Jarosz, D.F., Kowalko, J.E., Yoshizawa, M., Jeffery, W.R., Borowsky, R.L., Lindquist, S., and Tabin, C.J. (2013). Cryptic Variation in Morphological Evolution: HSP90 as a Capacitor for Loss of Eyes in Cavefish. *Science* 342, 1372–1375.
- Romero, A. (1985). Cave colonization by fish: role of bat predation. *Nat. Am. Midl.* 113, 7–12.
- Romero, A. (2001). Scientists prefer them blind: the history of hypogean fish research. *Environ. Biol. Fishes* 62, 43–71.
- Romero, A., and Green, S.M. (2005). The end of regressive evolution: examining and interpreting the evidence from cave fishes. *J. Fish Biol.* 67, 3–32.
- Romero, A., and Paulson, K.M. (2001). It's a wonderful hypogean life: a guide to the troglomorphic fishes of the world. *Environ. Biol. Fishes* 62, 13–41.
- Romero, A., Green, S.M., Romero, A., Lelonek, M.M., and Stropnický, K.C. (2003). One eye but no vision: Cave fish with induced eyes do not respond to light. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 300, 72–79.
- Romero Díaz, A. (2009). *Cave biology: life in darkness* (Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press).
- Rutherford, S.L., and Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396, 336–342.
- Şadoğlu, P. (1957). Mendelian inheritance in the hybrids between the Mexican blind cave fishes and their overground ancestor. *Verhandlungen Dtsch. Zool. Ges.* 432–439.
- Saint-Geniez, M., and D'Amore, P.A. (2004). Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 1045–1058.
- Salin, K., Voituron, Y., Mourin, J., and Hervant, F. (2010). Cave colonization without fasting capacities: an example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 156, 451–457.
- Salzburger, W., and Meyer, A. (2004). The species flocks of East African cichlid fishes: recent advances in molecular phylogenetics and population genetics. *Naturwissenschaften* 91, 277–290.
- Saxena, A., Peng, B.N., and Bronner, M.E. (2013). Sox10-dependent neural crest origin of olfactory microvillous neurons in zebrafish. *eLife* 2.

- Schemmel, C. (1967). Vergleichende Untersuchungen an den Hautsinnesorganen ober- und unterirdisch lebender *Astyanax*-Formen: Ein Beitrag zur Evolution der Cavernicolen. *Z. für Morphol. Tiere* 61, 255–316.
- Schemmel, C. (1980). Studies on the genetics of feeding behaviour in the cave fish *Astyanax mexicanus* f. *anoptichthys*. *Z Tierpsychol.* 53, 9–22.
- Semina, E.V., Bosenko, D.V., Zinkevich, N.C., Soules, K.A., Hyde, D.R., Vihtelic, T.S., Willer, G.B., Gregg, R.G., and Link, B.A. (2006). Mutations in laminin alpha 1 result in complex, lens-independent ocular phenotypes in zebrafish. *Dev. Biol.* 299, 63–77.
- Shapiro, M.D., Marks, M.E., Peichel, C.L., Blackman, B.K., Nereng, K.S., Jónsson, B., Schluter, D., and Kingsley, D.M. (2004). Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature* 428, 717–723.
- Shi, X., Bosenko, D.V., Zinkevich, N.S., Foley, S., Hyde, D.R., Semina, E.V., and Vihtelic, T.S. (2005). Zebrafish *pitx3* is necessary for normal lens and retinal development. *Mech. Dev.* 122, 513–527.
- Shi, X., Luo, Y., Howley, S., Dzialo, A., Foley, S., Hyde, D.R., and Vihtelic, T.S. (2006). Zebrafish *foxe3*: roles in ocular lens morphogenesis through interaction with *pitx3*. *Mech. Dev.* 123, 761–782.
- Sjödäl, M., Edlund, T., and Gunhaga, L. (2007). Time of exposure to BMP signals plays a key role in the specification of the olfactory and lens placodes *ex vivo*. *Dev. Cell* 13, 141–149.
- Smith, A.A., Wyatt, K., Vacha, J., Vihtelic, T.S., Samuel Zigler, J., Wistow, G.J., and Posner, M. (2006). Gene duplication and separation of functions in alphaB-crystallin from zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS J.* 273, 481–490.
- Soares, D., Yamamoto, Y., Strickler, A.G., and Jeffery, W.R. (2004). The lens has a specific influence on optic nerve and tectum development in the blind cavefish *Astyanax*. *Dev. Neurosci.* 26, 308–317.
- Soules, K.A., and Link, B.A. (2005). Morphogenesis of the anterior segment in the zebrafish eye. *BMC Dev. Biol.* 5, 12.
- Stern, D.L., and Orgogozo, V. (2008). THE LOCI OF EVOLUTION: HOW PREDICTABLE IS GENETIC EVOLUTION? *Evolution* 62, 2155–2177.
- Strecker, U., Faúndez, V.H., and Wilkens, H. (2004). Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 469–481.
- Streit, A. (2007). The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 447–461.
- Streit, A. (2008). The cranial sensory nervous system: specification of sensory progenitors and placodes. *StemBook*.
- Strickler, A.G., and Jeffery, W.R. (2009). Differentially expressed genes identified by cross-species microarray in the blind cavefish *Astyanax*. *Integr. Zool.* 4, 99–109.
- Strickler, A.G., Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2001). Early and late changes in Pax6 expression accompany eye degeneration during cavefish development. *Dev. Genes Evol.* 211, 138–144.

- Strickler, A.G., Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2007a). The lens controls cell survival in the retina: Evidence from the blind cavefish *Astyanax*. *Dev. Biol.* *311*, 512–523.
- Strickler, A.G., Byerly, M.S., and Jeffery, W.R. (2007b). Lens gene expression analysis reveals downregulation of the anti-apoptotic chaperone α A-crystallin during cavefish eye degeneration. *Dev. Genes Evol.* *217*, 771–782.
- Suetsugu-Maki, R., Maki, N., Nakamura, K., Sumanas, S., Zhu, J., Del Rio-Tsonis, K., and Tsonis, P.A. (2012). Lens regeneration in axolotl: new evidence of developmental plasticity. *BMC Biol.* *10*, 103.
- Suzuki, Y. (2010). Statistical methods for detecting natural selection from genomic data. *Genes Genet. Syst.* *85*, 359–376.
- Sylvester, J.B., Rich, C.A., Loh, Y.-H.E., van Staaden, M.J., Fraser, G.J., and Streelman, J.T. (2010). Brain diversity evolves via differences in patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 9718–9723.
- Sylvester, J.B., Rich, C.A., Yi, C., Peres, J.N., Houart, C., and Streelman, J.T. (2013). Competing signals drive telencephalon diversity. *Nat. Commun.* *4*, 1745.
- Templeton, J.P., Wang, X., Freeman, N.E., Ma, Z., Lu, A., Hejtmancik, F., and Geisert, E.E. (2013). A crystallin gene network in the mouse retina. *Exp. Eye Res.* *116*, 129–140.
- Tenesa, A., Navarro, P., Hayes, B.J., Duffy, D.L., Clarke, G.M., Goddard, M.E., and Visscher, P.M. (2007). Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. *Genome Res.* *17*, 520–526.
- Teyke, T. (1990). Morphological differences in neuromasts of the blind cave fish *Astyanax hubbsi* and the sighted river fish *Astyanax mexicanus*. *Brain. Behav. Evol.* *35*, 23–30.
- Teyke, T., and Schaerer, S. (1994). Blind Mexican cave fish (*Astyanax hubbsi*) respond to moving visual stimuli. *J. Exp. Biol.* *188*, 89–101.
- Thisse, C., and Thisse, B. (2005). High Throughput Expression Analysis of ZF-Models Consortium Clones. ZFIN Direct Data Submiss.
- Toro, S., and Varga, Z.M. (2007). Equivalent progenitor cells in the zebrafish anterior preplacodal field give rise to adenohypophysis, lens, and olfactory placodes. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, pp. 534–542.
- Toyofuku, K., Valencia, J.C., Kushimoto, T., Costin, G.-E., Virador, V.M., Vieira, W.D., Ferrans, V.J., and Hearing, V.J. (2002). The etiology of oculocutaneous albinism (OCA) type II: the pink protein modulates the processing and transport of tyrosinase. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *15*, 217–224.
- Tymchuk, W.E., Sundström, L.F., and Devlin, R.H. (2007). Growth and survival trade-offs and outbreeding depression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Evol. Int. J. Org. Evol.* *61*, 1225–1237.
- Ueda, Y., Duncan, M.K., and David, L.L. (2002). Lens proteomics: the accumulation of crystallin modifications in the mouse lens with age. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *43*, 205–215.
- Varatharasan, N., Croll, R.P., and Franz-Odenaal, T. (2009). Taste bud development and patterning in sighted and blind morphs of *Astyanax mexicanus*. *Dev. Dyn.* *238*, 3056–3064.

- Varga, Z.M., Wegner, J., and Westerfield, M. (1999). Anterior movement of ventral diencephalic precursors separates the primordial eye field in the neural plate and requires cyclops. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 5533–5546.
- Vihtelic, T.S. (2008). Chapter 6 Teleost Lens Development and Degeneration. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 341–373.
- Voituron, Y., de Fraipont, M., Issartel, J., Guillaume, O., and Clobert, J. (2011). Extreme lifespan of the human fish (*Proteus anguinus*): a challenge for ageing mechanisms. *Biol. Lett.* *7*, 105–107.
- Waddington, C.H. (1942). Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters. *Nature* *150*, 563–565.
- Wallace, A.R. (1858). On the Tendency of Varieties to depart indefinitely from the Original Type.
- Wang, H., Kesinger, J.W., Zhou, Q., Wren, J.D., Martin, G., Turner, S., Tang, Y., Frank, M.B., and Centola, M. (2008). Identification and characterization of zebrafish ocular formation genes. *Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can.* *51*, 222–235.
- Wawersik, S., Purcell, P., Rauchman, M., Dudley, A.T., Robertson, E.J., and Maas, R. (1999). BMP7 acts in murine lens placode development. *Dev. Biol.* *207*, 176–188.
- Wigle, J.T., Chowdhury, K., Gruss, P., and Oliver, G. (1999). Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat. Genet.* *21*, 318–322.
- Wilkens, H. (1988). Evolution and Genetics of Epigeal and Cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the Neutral Mutation Theory. *Evol Biol* *23*, 271–367.
- Wilkens, H. (2007). Regressive evolution: ontogeny and genetics of cavefish eye rudimentation. *Biol. J. Linn. Soc.* *92*, 287–296.
- Wilkens, H. (2010). Genes, modules and the evolution of cave fish. *Heredity* *105*, 413–422.
- Wilkens, H., and Burns, J.R. (1972). A new *Anoptichthys* cave population. *Ann Speleol* *27*, 263–270.
- Wistow, G., Wyatt, K., David, L., Gao, C., Bateman, O., Bernstein, S., Tomarev, S., Segovia, L., Slingsby, C., and Vihtelic, T. (2005). γ N-crystallin and the evolution of the $\beta\gamma$ -crystallin superfamily in vertebrates: γ N-crystallin. *FEBS J.* *272*, 2276–2291.
- Yamamoto, Y. (1976). Growth of lens and ocular environment: role of neural retina in the growth of mouse lens as revealed by an implantation experiment. *Dev. Growth Differ.* *18*, 273–278.
- Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2000). Central Role for the Lens in Cave Fish Eye Degeneration. *Science* *289*, 631–633.
- Yamamoto, Y., Stock, D.W., and Jeffery, W.R. (2004). Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* *431*, 844–847.
- Yamamoto, Y., Byerly, M.S., Jackman, W.R., and Jeffery, W.R. (2009). Pleiotropic functions of embryonic sonic hedgehog expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Dev. Biol.* *330*, 200–211.

- Yi, Z., Garrison, N., Cohen-Barak, O., Karafet, T.M., King, R.A., Erickson, R.P., Hammer, M.F., and Brilliant, M.H. (2003). A 122.5-kilobase deletion of the P gene underlies the high prevalence of oculocutaneous albinism type 2 in the Navajo population. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 62–72.
- Yokoyama, S., Meany, A., Wilkens, H., and Yokoyama, R. (1995). Initial mutational steps toward loss of opsin gene function in cavefish. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 527–532.
- Yoshizawa, M., Gorički, Š., Soares, D., and Jeffery, W.R. (2010). Evolution of a Behavioral Shift Mediated by Superficial Neuromasts Helps Cavefish Find Food in Darkness. *Curr. Biol.* **20**, 1631–1636.
- Yoshizawa, M., Yamamoto, Y., O’Quin, K.E., and Jeffery, W.R. (2012). Evolution of an adaptive behavior and its sensory receptors promotes eye regression in blind cavefish. *BMC Biol.* **10**, 108.
- Yoshizawa, M., Jeffery, W., Van Netten, S., and McHenry, M. (2013a). The sensitivity of lateral line receptors and their role in the behavior of Mexican blind cavefish (*Astyanax mexicanus*). *J. Exp. Biol.*
- Yoshizawa, M., Kelly, E.O., and Jeffery, W.R. (2013b). Evolution of an adaptive behavior and its sensory receptors promotes eye regression in blind cavefish: response to Borowsky (2013). *BMC Biol.* **11**, 82.
- Young, R.W., and Fulhorst, H.W. (1966). Regional differences in protein synthesis within the lens of the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **5**, 288–297.
- Yun, S., Saijoh, Y., Hirokawa, K.E., Kopinke, D., Murtaugh, L.C., Monuki, E.S., and Levine, E.M. (2009). Lhx2 links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 3895–3906.
- Zandy, A.J., and Bassnett, S. (2007). Proteolytic Mechanisms Underlying Mitochondrial Degradation in the Ocular Lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 293–302.
- Zhang, L., Yan, H.-F., Wu, W., Yu, H., and Ge, X.-J. (2013). Comparative transcriptome analysis and marker development of two closely related Primrose species (*Primula poissonii* and *Primula wilsonii*). *BMC Genomics* **14**, 329.
- Zhang, Y., Burgess, D., Overbeek, P.A., and Govindarajan, V. (2008). Dominant inhibition of lens placode formation in mice. *Dev. Biol.* **323**, 53–63.
- Zilinski, C.A., Shah, R., Lane, M.E., and Jamrich, M. (2005). Modulation of zebrafish *pitx3* expression in the primordia of the pituitary, lens, olfactory epithelium and cranial ganglia by hedgehog and nodal signaling. *Genesis* **41**, 33–40.
- Zilles, K., Tillmann, B., and Bennemann, R. (1983). The development of the eye in *Astyanax mexicanus* (Characidae, Pisces), its blind cave derivative, *Anoptichthys jordani* (Characidae, Pisces), and their crossbreds. *Cell Tissue Res.* **229**, 423–432.
- (2000). An introduction to genetic analysis (New York: W.H. Freeman).

ANNEXES (articles en coauteur)

A. Evolution du développement du quadrant ventral de la rétine chez *Astyanax*

Article de Pottin et al., publié dans *Development* en 2011.

Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the *Shh* and *Fgf8* forebrain organising centres

Karen Pottin, Hélène Hinaux and Sylvie Rétaux*

SUMMARY

The cavefish morph of the Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*) is blind at adult stage, although an eye that includes a retina and a lens develops during embryogenesis. There are, however, two major defects in cavefish eye development. One is lens apoptosis, a phenomenon that is indirectly linked to the expansion of ventral midline sonic hedgehog (*Shh*) expression during gastrulation and that induces eye degeneration. The other is the lack of the ventral quadrant of the retina. Here, we show that such ventralisation is not extended to the entire forebrain because fibroblast growth factor 8 (*Fgf8*), which is expressed in the forebrain rostral signalling centre, is activated 2 hours earlier in cavefish embryos than in their surface fish counterparts, in response to stronger *Shh* signalling in cavefish. We also show that neural plate patterning and morphogenesis are modified in cavefish, as assessed by *Lhx2* and *Lhx9* expression. Inhibition of Fgf receptor signalling in cavefish with SU5402 during gastrulation/early neurulation mimics the typical surface fish phenotype for both *Shh* and *Lhx2/9* gene expression. Fate-mapping experiments show that posterior medial cells of the anterior neural plate, which lack *Lhx2* expression in cavefish, contribute to the ventral quadrant of the retina in surface fish, whereas they contribute to the hypothalamus in cavefish. Furthermore, when *Lhx2* expression is rescued in cavefish after SU5402 treatment, the ventral quadrant of the retina is also rescued. We propose that increased *Shh* signalling in cavefish causes earlier *Fgf8* expression, a crucial heterochrony that is responsible for *Lhx2* expression and retina morphogenesis defect.

KEY WORDS: Lhx2, Heterochrony, Neural plate

INTRODUCTION

The teleost fish *Astyanax mexicanus* exists in two forms: a surface-dwelling river morph and a cave-living blind morph. The two forms of this single species split from a common ancestor about 1 million years ago, a relative short period of time during which the cave animals have evolved both regressive and constructive features (Jeffery, 2001). The loss of eyes and pigmentation, and the increase in feeding apparatus (jaws, teeth, taste-buds) (Varatharasan et al., 2009; Yamamoto et al., 2009) and body fat content (Rose and Mitchell, 1982; Salin et al., 2010) are distinctive features of cavefish when compared with their surface counterparts. *Astyanax* embryos are therefore excellent models with which to analyse the molecular and cellular developmental mechanisms of morphological evolution (Jeffery, 2008; Jeffery, 2009; Rétaux et al., 2008).

The anterior expression domain of the morphogen sonic hedgehog (*Shh*) at the embryonic ventral midline is expanded throughout cavefish forebrain development (Menuet et al., 2007; Yamamoto et al., 2004). The secondary loss of eyes is the most spectacular indirect consequence of this increased Shh signalling (Yamamoto et al., 2004). However, expanded *Shh* also causes significant and specific modifications in the ventral telencephalon and hypothalamus. In fact, Shh-dependent variations in proliferative activity and in expression of *Nkx* and LIM-

homeodomain transcription factors induce variations in specification and migrations of specific neuronal populations (Menuet et al., 2007). Besides these specific changes, the global early patterning of the forebrain, including the retina, is normal in cavefish. Indeed, the cavefish eyes undergo normal morphogenesis, growth and patterning during the first 24 hours of development, except for a slightly smaller retina size and a reduced or absent ventral quadrant of the retina, a hallmark of the cavefish embryonic eye (Alunni et al., 2007; Yamamoto and Jeffery, 2000; Yamamoto and Jeffery, 2002). The degeneration and loss of eyes in cavefish occur later and progressively in the following days and weeks (Alunni et al., 2007; Jeffery, 2001; Jeffery, 2005; Wilkens, 2007), and are triggered by lens apoptosis which starts after the first day of development (Strickler et al., 2007; Yamamoto and Jeffery, 2000). Thus, the marked increase in midline *Shh* expression in cavefish embryos does not have the deleterious consequences one might expect for such a powerful morphogen (for a review, see Monuki, 2007). This is strongly suggestive of compensation or balancing mechanism(s) that would 'protect' the cavefish forebrain from being totally disorganised by *Shh* expansion.

In all vertebrates, including fish, the anterior neural plate gives rise to the forebrain, including the telencephalon and the diencephalon, from which the optic vesicles and the hypothalamus develop. The growth, the morphogenesis and the patterning of the anterior neural plate are controlled by the concerted action of molecules secreted from signalling centres (also called secondary organisers) that diffuse through the neuroepithelium and impose a field of organisation (for a review, see Vieira et al., 2010). These signalling centres are mostly located along the embryonic midline and secrete morphogens such as Shh (Echelard et al., 1993), Wnt (wingless-Int) (Lee and Jessell, 1999; Muroyama et al., 2002) and

Equipe Développement Evolution du Cerveau Antérieur, UPR3294 NeD, CNRS,
Institut Alfred Fessard, 91198 Gif-sur-Yvette, France

*Author for correspondence (retaux@inaf.cnrs-qif.fr)

Sfrp (secreted frizzled related protein) (Houart et al., 2002), Bmp (bone morphogenetic protein) (Liem et al., 1997) or Fgf (fibroblast growth factor) (Shimamura and Rubenstein, 1997) molecules. Thus, the ventral signalling centre (notochord, and later floor and basal plate of the neural tube) secretes Shh, which induces ventral forebrain structures, whereas the rostral signalling centre (anterior neural ridge and telencephalon) secretes several Fgfs, including Fgf8 (Miyake et al., 2005), which is crucial for olfactory bulb growth and pallial patterning (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001; Shimogori et al., 2004; Storm et al., 2006).

A few studies have addressed the cross-regulatory interactions between signalling centres that shape the forebrain (Crossley et al., 2001; Hayhurst et al., 2008; Ohkubo et al., 2002; Okada et al., 2008; Shanmugalingam et al., 2000; Storm et al., 2006), but little is known about their relative influence, how they can modulate forebrain morphogenesis, or to what extent their tight regulation in time is crucial. Moreover, most studies are based on gain- or loss-of-function approaches in laboratory animals, which usually lead to lethal conditions. Here, we have used the *Astyanax* cavefish embryo as a natural mutant to study secondary organiser's interactions in time and space, as well as their developmental outcome in a physiological and adaptive context. We show that cavefish embryos express *Fgf8* 2 hours earlier than surface fish embryos, a heterochrony that has essential implications for anterior neural plate patterning at early stage and that is also responsible for retina morphogenesis defect at later stage. By interfering pharmacologically with this *Fgf8* heterochrony, we were able to rescue the ventral quadrant of the cavefish retina, i.e. to rescue the neural component of the eye defect in cavefish.

MATERIALS AND METHODS

Fish samples

Laboratory stocks of *A. mexicanus* surface fish and cavefish (Pachón population) were obtained in 2004 from the Jeffery laboratory at the University of Maryland, College Park, MD. Fish are maintained at 23–26°C on a 12:12 hours light:dark cycle. Embryos were collected after spawning and fixed at various stages in 4% paraformaldehyde (PFA). After progressive dehydration in methanol, they were stored at –20°C. *A. mexicanus* development is highly similar to zebrafish in the first 20 hours post-fertilisation (hpf) and, importantly, there is no difference in early developmental timing between the cave and surface forms (DETAILS OF RESEARCHERS, unpublished developmental timetable; see Fig. S3 in the supplementary material).

cDNA cloning

Total RNA from cavefish embryo at 20 hpf was reverse transcribed with random primers using AMV reverse transcriptase (Promega). Partial cDNA sequence for *Fgf3* (341 bp, GenBank HQ667934) was amplified by PCR using degenerated primers designed after alignments of several teleost sequences (sequences available on request). PCR products were subcloned in TOPO-PCR II vector (Invitrogen) and sequenced. *Shh* (AY661431), *Nkx2.1a* (AY661435) and *Bmp4* (DQ915173) cDNA were previously isolated by the Jeffery and Stock laboratories, and *Fgf8* (DQ822511), *Lhx2* (EF175737) and *Lhx9* (EF175738) cDNAs were previously cloned by our group (Alunni et al., 2007).

Whole-mount in situ hybridisation

cDNAs were amplified by PCR, and digoxigenin- or fluorescein-labelled riboprobes were synthesised from PCR templates. A protocol for automated whole-mount in situ hybridisation (Intavis) was performed (Deyts et al., 2005).

For fluorescent in situ hybridisation, Cy3- and FITC-tyramides were prepared as described by P. Vize (University of Calgary, Canada) in Xenbase (<http://www.xenbase.org/common/>). Embryos were incubated with antibody anti-FITC-POD (Roche, 1/250), washed in PBS/Tween 0.1% (PBST) and

incubated for 20 minutes at room temperature with FITC-tyramide at 1/100. Tyramides were activated by H₂O₂ (Sigma, 0.001%) for 30 minutes and washed again in PBST. The first peroxidase conjugate was inactivated by incubation in 2% H₂O₂ for 1 hour. Embryos were washed in PBST and incubated with the second antibody (anti-digoxigenin-POD, Roche, 1/250). The same protocol was applied for the Cy3-tyramide revelation.

Quantitative real time RT-PCR

Total RNA was extracted from head or tail at 10 hpf (0 somite) or 14 hpf (10 somites) of cavefish or surface fish embryos using RNA TRIzol. cDNAs were synthesised using SuperScript II (Invitrogen) and PCR was performed using dsDNA dye SYBR Green I (Roche Diagnostics). Primer pairs for *Fgf8* (sense, 5'-GCAGGCTAATACGACC-3' and antisense, 5'-ACTGCCGAATGTGTCT-3') and control α -actin (sense, 5'-CATTACCACTGGGACG-3', and antisense, 5'-TCTTCTCACGGTTAGCC-3') were used to detect target gene transcripts. SYBR Green analysis was performed on a Lightcycler (Roche Diagnostics). All samples were analyzed in duplicate in three independent experiments, and the amount of mRNA detected was normalised to control α -actin mRNA values. We used normalised data to quantify the relative levels of *Fgf8* mRNA according to cycling threshold analysis (Δ Ct).

SU5402 and cyclopamine treatments

For incubation with the FGFR inhibitor SU5402 (Calbiochem), embryos were dechorionated manually and allowed to develop in embryo medium containing Methylene Blue (EMM) in petri dishes coated with a layer of 1% agarose. Upon reaching the desired stage, they were incubated in SU5402 diluted in EMM from a 3 mM stock solution in DMSO. Control embryos had an equivalent volume of DMSO added to the EMM. Following incubation, embryos were washed gently in several changes of EMM and fixed immediately (at six somites), or allowed to develop until 27 hpf.

For incubation with cyclopamine (Toronto Research Chemicals), the same protocol was used. Control embryos were exposed to 0.1% ethanol, as the cyclopamine stock solution was diluted in 100% ethanol.

Quantification of expression pattern modification was performed manually on in toto pictures of embryos at 12 hpf (six somites) photographed in the same orientation using agarose wells. For the measurement of the CF ventral quadrant and lens, ImageJ was used. All the data come from at least three independent experiments and statistical comparisons were performed using a Student's *t* test.

Dextran iontophoresis

The method was adapted from The Zebrafish book (Westerfield, 2000). Briefly, dextran tetramethyl-rhodamine (D3308, Molecular Probes) in KCl 0.1 M was injected into the neural plate of 10 hpf embryos embedded in 3% methyl cellulose under the control of a fluorescence stereomicroscope (200×, Leica). Embryos were individually photographed 1 hour after injection. Embryos were transferred into wells coated with 1% agarose and kept in 1.5 ml EMM at 23°C. The next day, embryos were anaesthetised in tricaine methane sulphate (MS222, Sigma, 0.2 mg/ml) and their eyes and brain were photographed using an Apotome microscope (Zeiss). For the fate map analysis, the neural plate of each embryo was outlined using the bright-field picture (Fig. 5A,H). Fluorescent pictures were superimposed and injection domains were reported on the neural plate drawing (Fig. 5A',H'). According to the progeny observed at 27 hpf, a colour was attributed to the injection domain. Finally, all the individual neural plate drawings were superimposed and a fate map was obtained.

RESULTS

Fgf8 is turned on 2 hours earlier in the cavefish telencephalon

In cavefish (CF), the *Shh* ventral midline expression domain is expanded laterally and anteriorly, throughout gastrulation, neurulation and later on, when compared with surface fish (SF) (Fig. 1A–C'; see Fig. S1A,A' in the supplementary material) (Yamamoto et al., 2004). Such expansion concerns various tissues as development proceeds. At the end of gastrulation and early neural plate stage (i.e. before

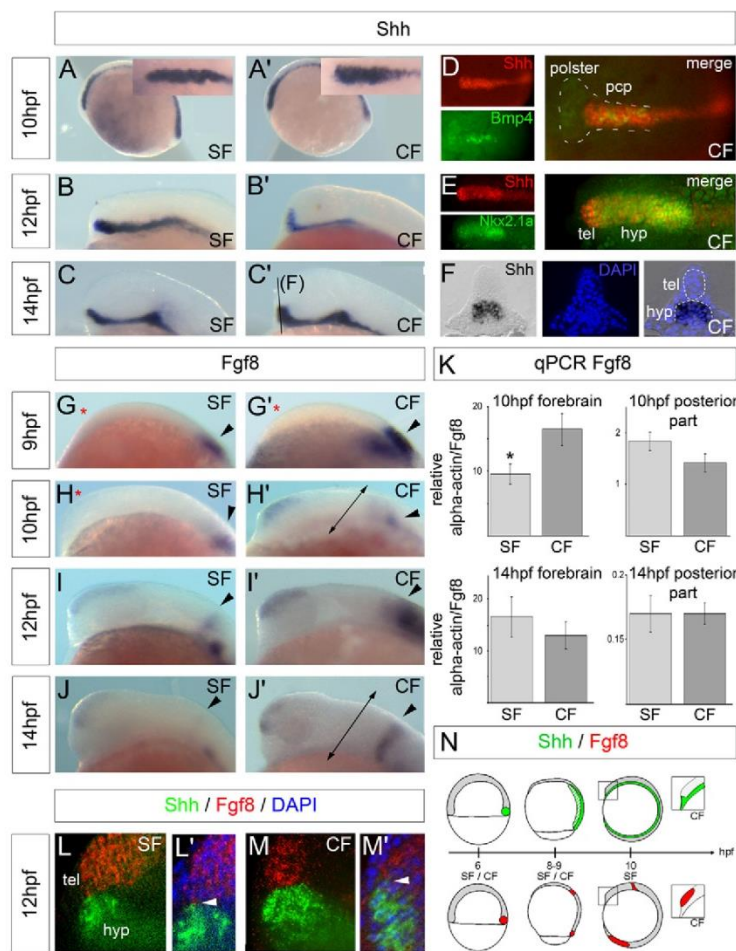


Fig. 1. *Shh* and *Fgf8* expression patterns in SF and CF. Anterior is leftwards and dorsal is upwards. (A-C') *Shh* expression at 10 hpf (A,A'), 12 hpf (B,B') and 14 hpf (C,C') on lateral views. *Shh* is expanded anteriorly and laterally (insets in A,A') in CF. (D) Double fluorescence in situ hybridisation for *Shh* (red) and *Bmp4* (green, a prechordal and polster marker) showing that *Shh* is enlarged in the prechordal plate (PcP) of a 10 hpf CF embryo. (E) Double fluorescence in situ hybridisation for *Shh* (red) and *Nkx2.1a* (green, a hypothalamic marker) showing that *Shh* is enlarged in the ventral neural tube, including the hypothalamus (hyp) and the anterior-most telencephalon (tel) of a 12 hpf CF embryo. (F) Second rostralmost frontal section through a 14 hpf CF showing that *Shh* is enlarged in the hypothalamus. DAPI counterstaining of nuclei is in blue. See Fig. S2 in the [supplementary material](#) for the complete anteroposterior series of sections. (G-J') *Fgf8* expression at 9 hpf, 10 hpf, 12 hpf and 14 hpf. *Fgf8* is expressed in the telencephalon from 10 hpf in CF and from 12 hpf in SF. Black arrowheads indicate the MHB, red asterisks indicate absence of *Fgf8* expression and double-headed arrows indicate the level where the 'forebrain' (=telencephalon) and 'posterior part' (=mhb+tailbud) samples were cut for subsequent qPCR analysis. (K) Histograms of qRT-PCR results showing increased levels of *Fgf8* mRNA relative to α -actin mRNA in the CF head at 10 hpf. An arrowhead in M' indicates the level analysed. * $P < 0.05$ in one-way ANOVA comparing SF and CF mRNA levels ($n=3$). Data are mean \pm s.e.m. (L-M') Double fluorescence in situ hybridisation for *Shh* (green) and *Fgf8* (red) transcripts. The two transcripts are never expressed in a same cell. A white arrowhead indicates the boundary between the two domains. (N) Scheme of *Shh* (green) and *Fgf8* (red) expression patterns during gastrulation and at the beginning of neurulation in *Astyanax*. At 10 hpf in CF (insets), *Shh* is expanded anteriorly and *Fgf8* is already expressed in the telencephalon.

neurulation, which starts at 10 hpf in *Astyanax*; see Fig. S1B,B' in the [supplementary material](#)). *Shh* expansion concerns the axial ventral midline represented at its rostral tip by the *Bmp4*-positive prechordal plate (PcP) (Fig. 1D). After neurulation, at 12 hpf (5-6 somites), *Shh* expansion concerns the medial/ventral part of the neural tube, which corresponds to the *Nkx2.1a*-positive presumptive hypothalamus, and also very transiently to the ventralmost telencephalon (Fig. 1E). Two hours later, at 14 hpf (11-12 somites), *Shh* expression is still expanded in the hypothalamus (Fig. 1F and see Fig. S2 in the [supplementary material](#)).

We hypothesised that other signalling molecules may be modified at the CF anterior neural plate. Among those tested and compared in CF and SF embryos between 10 hpf and 16 hpf, *Fgf8* expression showed a difference. In fact, *Fgf8* was detectable by in situ hybridisation in the CF telencephalon as early as 10 hpf, whereas it was apparent only at 12 hpf in SF (Fig. 1G-J'). Of note, earlier expression domains of *Fgf8* in the shield at 6-7 hpf and in the tailbud and the presumptive mid-hindbrain junction (mhb) at 8-9 hpf was identical in the two populations (see Fig. S1C-D' in the [supplementary material](#)), and expression was indistinguishable again at 14 hpf (Fig. 1J-J'). Importantly, the timing of neurulation which starts between 9.6 hpf and 10 hpf, and is completed by 12 hpf in *Astyanax*, is totally synchronous between CF and SF

embryos (see Fig. S3 in the [supplementary material](#)), ruling out the possibility that *Fgf8* expression heterochrony could be due to differences in developmental timing of the morphogenesis between the two populations of embryos.

To confirm these qualitative observations in a quantitative manner, we performed real-time quantitative RT-PCR (Fig. 1K). At 10 hpf, *Fgf8* transcripts were 42% more abundant in the forebrain of CF embryos when compared with their SF counterparts, whereas the posterior part of SF and CF embryos (including the mhb and tailbud expression domains) contained similar *Fgf8* transcript levels. No difference was observed in the 14 hpf samples, confirming the in situ hybridisation data. As several Fgfs, including *Fgf3*, are implicated in early telencephalic Fgf signalling (Walshe and Mason, 2003), we also compared *Fgf3* expression in CF versus SF. The two types of embryos showed identical *Fgf3* patterns at crucial time points between 9.5 hpf and 12 hpf (and later, not shown), including in the telencephalon, mhb and rhombomere 4 (see Fig. S1F-G' in the [supplementary material](#)). In summary, these comparative expression data show a heterotopy of *Shh* expression in the PcP and the hypothalamus and a heterochrony of *Fgf8* expression in the telencephalon at stages between 10 and 12 hpf, i.e. when these two signalling systems organise the anterior neural plate and future forebrain.

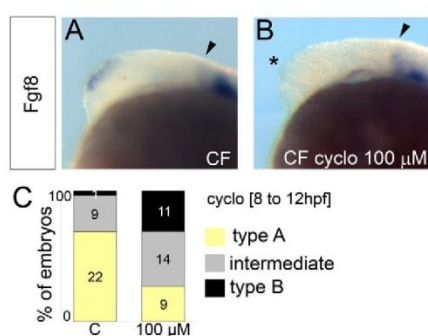


Fig. 2. Cyclopamine treatment affects *Fgf8* expression in the telencephalon but not the mhb. (A,B) Anterior is leftwards and dorsal is upwards. *Fgf8* expression in a 12 hpf control CF (A) and a CF incubated in 100 µM cyclopamine from 8 to 12 hpf (B). The arrowheads indicate the MHB. Asterisk indicates xxxx. (C) Quantification of cyclopamine effect. The y-axis indicates the percentage of embryos with a given phenotype and the number of scored embryos is indicated in columns. Type A is the wild-type CF phenotype (yellow, shown in A). Type B showed no *Fgf8* expression in the dorsal forebrain (black, shown in B). Intermediate embryos (grey) showed diminished/faint *Fgf8* expression.

We next examined whether the *Shh-Fgf8* spatial relationship is modified between the two populations. Double fluorescence in situ hybridisation revealed that in both CF and SF embryos, the two expression domains – the *Fgf8*-positive telencephalon (alar plate) and the *Shh*-positive hypothalamus (basal plate) – are strictly adjacent and never overlap, with their boundary being shifted dorsally in CF (Fig. 1L-M'). Neighbouring cells express one or the other factor but never both (Fig. 1L',M', arrowheads). Thus, the *Shh* and the *Fgf8* signalling centres progress from the shield towards the anterior pole of the embryo as gastrulation and axis formation proceed (Fig. 1N). At 10 hpf, the future forebrain of CF embryos expresses significantly more transcripts for the two signalling molecules than its SF counterpart. The *Fgf8* heterochrony therefore probably explains why the CF forebrain is not ventralised, as one might expect from its *Shh* pattern.

***Fgf8* heterochrony in CF is due to increased *Shh* signalling**

We next sought to determine the origin of the *Fgf8* heterochrony in CF. We analysed the possibility that *Fgf8* is expressed earlier because *Shh* domain is expanded early on (Fig. 1A'; see Fig. S1A',B' in the supplementary material). We treated CF embryos with cyclopamine, an inhibitor of *Shh* signalling (Chen et al., 2002; Incardona et al., 1998). Embryos treated with 100 µM cyclopamine between 80% epiboly (8 hpf) and six somites (12 hpf) and grown to 27 hpf had their eyes localised more anteriorly than normal (mild pre-cyclopia phenotype), confirming the efficiency of the drug. CF embryos treated in these conditions had a normal mhb *Fgf8* pattern but showed reduced or no *Fgf8* telencephalic expression at 12 hpf (Fig. 2A-C), demonstrating a role for *Shh* in *Fgf8* induction, and suggesting that high *Shh* signalling in CF is responsible for the earlier onset of *Fgf8* expression.

Interfering with *Fgf* signalling in CF mimics SF phenotype

To test whether the *Fgf8* heterochrony compensates for enlarged *Shh* expression, we treated CF embryos with SU5402, an inhibitor of *Fgf* receptor signalling (Mohammadi et al., 1997) that is effective on *Astyanax* embryos (Gibert et al., 2010). The treatment was performed using two time windows, either from 50% epiboly (6hpf) or from 80% epiboly (8 hpf) to six somites (12 hpf). CF embryos incubated in SU5402 displayed a *Shh* expression pattern that mimicked the typical SF pattern (Fig. 3A-D). For quantification, embryos were scored according to the following criteria: (1) type A embryos, *Shh* expanded anteriorly as in a typical CF embryo; (2) type B embryos, *Shh* expression less expanded rostrally; (3) type C embryos, *Shh* expression like in a typical SF embryo. Examples of type A, type B and type C embryos are shown in Fig. 3A,B and C, respectively. Using this scoring method, the effect of SU5402 was found to be dose-dependent between 0.75 and 5 µM of the inhibitor and was more pronounced when the large window of treatment was used (Fig. 3E-F). This indicated that *Fgf* signalling is required for the stimulation and/or the maintenance of *Shh* expansion in CF embryos.

We also examined whether *Fgf8* expression is dependent upon *FgfR* signalling. SU5402 treatment on CF resulted in lateral and ventral expansion of the telencephalic *Fgf8* pattern (Fig. 3G-J). Again, this effect was dose dependent when assessed using the same type of scoring method as above (Fig. 3K). The *Fgf8* ventral expansion is correlated to the *Shh* posterior shift in the same condition of SU5402 treatment observed above, and the *Fgf8* lateral expansion suggests an *FgfR*-dependent negative feedback loop on *Fgf8* expression. In summary, pharmacological treatments of CF embryos allow the unmasking of several interactions between *Shh* and *Fgf8* signalling centres, including their reciprocal stimulation and an *FgfR*-dependent negative-feedback loop on *Fgf8* expression (Fig. 3L). Of note, the direct or indirect nature of these interactions is unknown.

***Fgf8* heterochrony influences anterior neural plate development**

We next asked to what extent the spatiotemporally modified signalling centres in CF affect anterior neural plate and early forebrain patterning and morphogenesis. To address this issue, we first used two LIM-homeodomain factors involved in eye and forebrain development, *Lhx2* and *Lhx9*, as regionalisation markers (Atkinson-Leadbetter et al., 2009; Porter et al., 1997; Tetreault et al., 2009; Yun et al., 2009; Zuber et al., 2003). Both factors showed significantly different expression patterns in CF and SF at 10 hpf (neural plate stage, Fig. 4A,A', summarised on Fig. 4F,F') and 12 hpf (closed neural plate, Fig. 4B-C',D-E'). In SF, the expression of the two genes covered the entire presumptive forebrain area, whereas in CF *Lhx2* expression was absent from its medial posterior part (asterisks in Fig. 4) and *Lhx9* expression was absent from its medial anterior part (arrowheads in Fig. 4). Of note, the differential patterns of *Lhx2* and *Lhx9* appear spatially correlated to those of *Shh* and *Fgf8* (Fig. 4A,A' for *Lhx2/Shh*).

Because SU5402-treated CF embryos display a SF-like *Shh* expression pattern (Fig. 3), we next analysed *Lhx2* and *Lhx9* expression patterns at 12 hpf after *FgfR* signalling inhibition. This treatment on CF mimicked the SF phenotype and restored SF-like *Lhx2* and *Lhx9* patterns at the posterior and anterior midline, respectively (Fig. 4G-K). The effects were dose

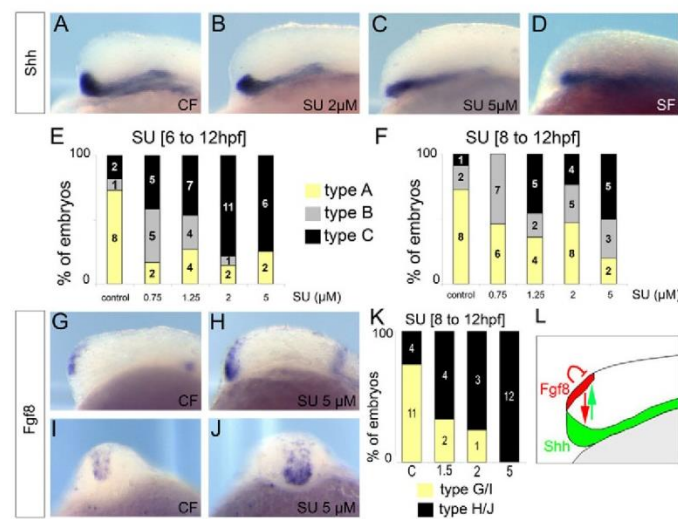


Fig. 3. SU5402 treatment affects *Shh* and *Fgf8* expression. (A–D) Anterior is leftwards and dorsal is upwards. 12 hpf *Shh* expression in control CF (A), in CF incubated with increasing concentrations of SU5402 (B,C) or in SF (D). Note the progressive ‘retraction’ of *Shh* expression with 2 and 5 μ M SU5402, mimicking the SF typical *Shh* pattern. (E,F) Quantification of SU5402 effect on *Shh* expression after longer (from 6 hpf to 12 hpf, E) or shorter (from 8 hpf to 12 hpf, F) treatment on CF. The y-axis indicates the percentage of embryos with a given phenotype and the number of scored embryos is indicated in columns. Type A is the wild-type CF phenotype (yellow, shown in A). Type C showed strongly retracted, SF-like, *Shh* expression at the PcP (black, shown in C/D). Type B showed intermediate pattern (grey, shown in B). Note that for both windows of treatment, the effects are dose dependent between 0.75 and 5 μ M of SU5402 compound. Anterior is leftwards and dorsal is upwards. (G–J) *Fgf8* expression in a 12hpf control CF (G, lateral view; I, frontal view) and a CF incubated in 5 μ M SU5402 from 8 to 12 hpf (H, lateral view; J, frontal view). (K) Quantification of effect of SU5402 on *Fgf8* expression after an 8 hpf to 12 hpf treatment on CF. Type G/I (yellow) is the wild-type CF phenotype. Type H/J (black) is the affected phenotype, showing lateral enlargement and anterior expansion of the *Fgf8* domain. (L) Summary drawing of the regulatory interactions between *Fgf8* and *Shh* signalling centres unmasked by cyclopamine and SU5402 treatments.

dependent, in the same range of concentrations as those that affect *Shh* expression (Fig. 4I,K). Thus, the CF anterior neural plate appears differentially organised, owing to its special signalling centres.

Precocious inhibition of Fgf signalling affects later retina morphogenesis

As *Lhx2* is a major factor for eye field specification and morphogenesis (Porter et al., 1997; Tetreault et al., 2009; Yun et al., 2009; Zuber et al., 2003), we next hypothesised that its modified pattern in CF may indicate different fates and/or movements of the posterior medial cells, and may be responsible for the absence of the ventral quadrant (vq) of the retina in CF embryos.

First, we determined the fate of the cells located in the medial posterior part of the presumptive forebrain, which express *Lhx2* in SF but not in CF. Dextran iontophoresis was applied in the anterior neural plate, including in this zone on 10 hpf embryos (Fig. 5A–A'', 5H–H''). The progeny of labelled cells was analysed 17 hours later (i.e. at 27 hpf) (Fig. 5B–E, I–J'').

In SF, the vast majority of injections led to the observation of labelled cells located in the retina, including the vq, and in the hypothalamus, at 27 hpf (31 out of 34 successfully injected embryos) (Fig. 5F,G). When injections targeted cells located in the posterior and medial *Lhx2*-positive SF neural plate, the labelled progeny contributed to the vq ($n=10$, pink) or to both the vq and the dorsal retina ($n=5$, black), or else to both the vq and the hypothalamus ($n=3$, dark blue). When injections targeted cells located either more laterally or more anteriorly in the neural plate,

the labelled progeny contributed to the dorsal retina ($n=10$, green) but neither to the vq nor to the hypothalamus (Fig. 5G). These data demonstrate that in SF, some of the cells located in the medial posterior part of the *Lhx2*-positive domain at neural plate stage give rise to the vq of the retina (Fig. 5F,G).

In CF, the deduced fate map was different (Fig. 5K). The general trend from 27 successfully injected CF embryos was an absence of cells fated to give rise to the vq (except for one cell in a CF specimen naturally possessing a small vq), and an enlargement of the presumptive territory for the basal diencephalon/hypothalamus. In fact, when injections targeted cells located in the posterior and medial *Lhx2*-negative CF neural plate, their major contribution was the hypothalamus ($n=7/7$, light blue) together with the dorsal retina ($n=4/7$, green). When injections were more lateral or anterior in the neural plate, their fate was the dorsal retina as in SF, but a large contribution to the hypothalamus was also found ($n=9/15$, light blue). In summary, these comparative fate maps show that SF and CF posterior medial forebrain neural plate give rise to distinct structures, suggesting a trade-off between ventral retina- and hypothalamic-fated territories in CF, and confirming major differences in patterning and cell movements in CF and SF at these stages.

Finally, we treated CF embryos with SU5402 between 8 and 12 hpf, and let them grow until 27 hpf. In these larvae, the vq was rescued (Fig. 5L,M) and was often indistinguishable from the SF normal eyes (Fig. 5N). Measurements of retina and vq sizes showed that upon SU5402 treatment, the vq contribution to eye size increases by ~50% (Fig. 5O). Conversely, SU5402 caused a

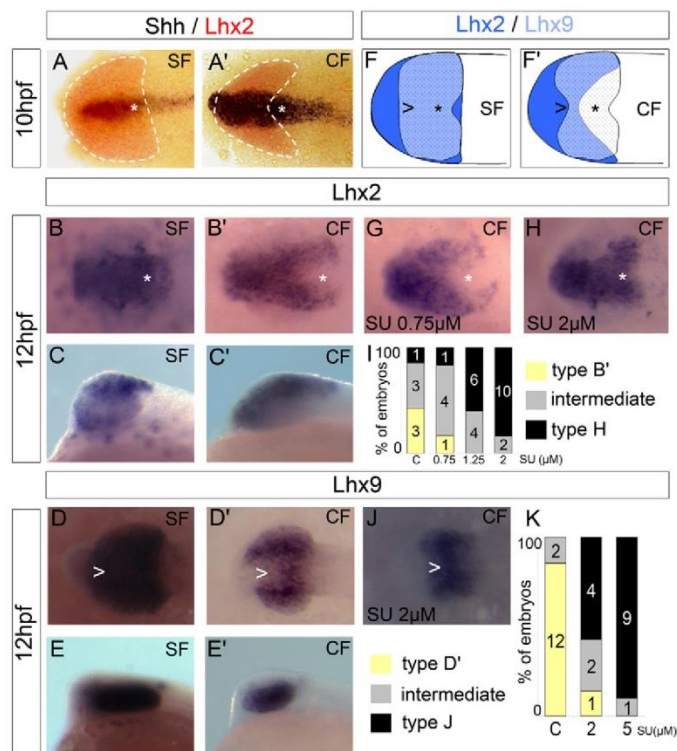


Fig. 4. *Lhx2* and *Lhx9* patterns differ between CF and SF and are affected by SU5402 treatment. Anterior is leftwards and dorsal is upwards. (A-E') Dorsal and lateral views of SF (A-E) and CF (A'-E') embryos hybridised with the indicated probes and at the indicated stages. At 10 hpf the expression of *Lhx2* (and *Lhx9*, not shown) on dorsal views appears large, indicating a 'flat' neural plate. At 12 hpf, it appears narrower because neurulation and keel formation is almost finished (see also Fig. S3 in the supplementary material). On dorsal views, the position in the neural plate where *Lhx2* and *Lhx9* expression is observed in SF but not in CF is indicated by symbols (asterisk for *Lhx2*, arrowheads for *Lhx9*). (F,F') Composite summary of the compared *Lhx2* and *Lhx9* patterns in SF and CF. (G-I) Effect of SU5402 treatment on *Lhx2* expression and quantification. The y-axis indicates the percentage of embryos with a given phenotype and the number of scored embryos is indicated in columns. Type B' is the wild-type CF phenotype (yellow, arrow-shaped) *Lhx2* pattern. Type G (grey) and type H (black) showed intermediate and SF-like phenotypes, respectively. (J,K) Effect of SU5402 treatment on *Lhx9* expression and quantification. Type D' is the wild-type CF phenotype (yellow, butterfly-shaped) *Lhx9* pattern. Type intermediate (grey) and type J (black) embryos showed intermediate and SF-like phenotypes, respectively.

small but significant reduction of the size of the lens (Fig. 5O), which must probably be attributed to modifications of the placodal field (Toro and Varga, 2007).

DISCUSSION

The eye defect in CF embryos has two components. One is placode related, as the triggering event for eye degeneration is lens apoptosis. The other is neural plate related, as the CF retina is smaller than the SF retina and lacks a normal vq. Here, we provide evidence that the neural plate component of the CF eye defect is driven by modifications not only in space (*Shh*) but also in time (*Fgf8*) of the expression of signalling molecules that shape the forebrain at neurula stage. The latter probably also explains why the entire CF forebrain is not ventralised by *Shh* overexpression (Fig. 6).

Cavefish: a natural mutant with which to analyse interactions between signalling centres.

Several papers have reported the function of *Shh* or *Fgf8* molecules through analysis of zebrafish or mouse mutants or loss-of-function experiments. Here, we have taken advantage of the two *Astyanax* populations to study and uncover the impact of subtle spatial and temporal modifications of these signalling pathways on forebrain morphogenesis. In this model system, the SF are considered as the 'wild-type' animals, whereas the CF and their expanded embryonic *Shh* expression domain and blind adult phenotype are viewed as the 'mutants'. The advantage we see in this comparison is that the modifications we uncover in CF embryos are probably adaptive, as genetic analyses have shown that mutations in genes affecting the eye phenotype in CF are driven by natural selection (Protas et al., 2007).

We found a 2 hours difference in the appearance of *Fgf8* transcripts between the two populations. We interpret this finding by proposing that a *Shh* threshold level is reached earlier in the CF anterior neural plate, as suggested by cyclopamine experiments. Such threshold effects were recently demonstrated for *Shh* signalling controlling facial morphogenesis (Young et al., 2010). This is also consistent with mammalian data showing a loss of *Fgf8* expression in the anterior neural ridge of *Shh* mouse mutants (Hayhurst et al., 2008; Ohkubo et al., 2002), and with zebrafish data showing that cyclopamine treatment from 5 hpf to 15 hpf decreases telencephalic but not mhb *Fgf8* expression (Miyake et al., 2005). In both fish species and in mammals, *Shh* therefore appears to stimulate *Fgf8* expression at the rostral telencephalon.

In turn, we show with SU5402 experiments that Fgfr signalling allows the maintenance of *Shh* overexpression in the PcP and hypothalamus. We observed subtle but significant differences in the results depending on the time-window used for the SU5402 treatment. More embryos were affected when the drug was applied from 6 to 12 hpf when compared with the 8 to 12 hpf window. This indicates that a stimulation of *Shh* expression through Fgfr signalling occurs throughout gastrulation and the beginning of neurulation. Of note, similar interactions were described in the neural plate in other species. For example, a reduction in *Fgf8* dose leads to a diminution of *Shh* expression in the mouse subpallium (Storm et al., 2006). In addition, in zebrafish, *Shh* is not expressed in the telencephalon of *ace* (*Fgf8a*) mutants (Shanmugalingam et al., 2000), and injection of *Fgf8* and *Fgf3* morpholinos decrease hypothalamic *Shh* expression (Walshe and Mason, 2003).

Shh and *Fgf8* are powerful morphogens, known to be implicated in the control of cell proliferation. In CF, the *Shh* expression domain is expanded and *Fgf8* is expressed precociously, suggesting

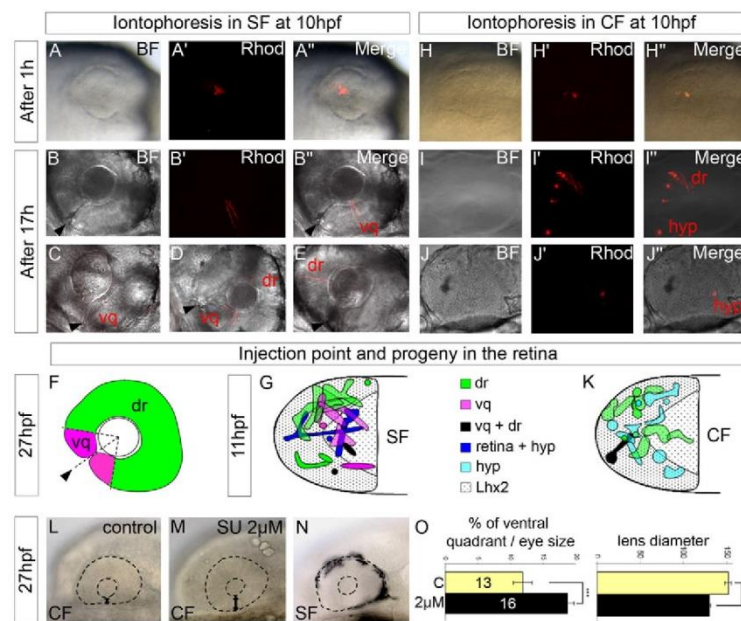


Fig. 5. Comparative fate-mapping of the eye-field in SF and CF, and SU5402-induced rescue of the retina ventral quadrant in CF. Anterior is leftwards and dorsal is upwards. (A-E) Rhodamine dextran iontophoresis in SF performed at 10 hpf. One hour after injection (i.e. at 11 hpf), embryos were photographed to record the dextran injection position on the neural plate (A, bright field, BF; A', fluorescence, Rhod; A'', merge). Seventeen hours after injection (i.e. at 27 hpf) the eyes and brain were photographed. Several examples are shown (B-E), with labelled cells in the ventral quadrant (vq), the dorsal retina (dr), or both. In all panels, an arrowhead indicates the ventral fissure of the retina, taken as a landmark for the definition of the vq. (F,G) Fate-map of the anterior neural plate in SF. Injection points are colour-coded according to the location of their progeny. Green, contribution to dorsal retina (dr, \pm other forebrain parts); pink, contribution to ventral quadrant (vq, \pm other forebrain parts); black, vq+dr; blue, retina (R) + hypothalamus (hyp). The superimposed dotted shading indicates for correlation the typical *Lhx2* expression pattern difference between SF and CF. (H-J'') Examples of rhodamine dextran iontophoresis in CF (H-H', bright field; H'-J'', fluorescence; H''-J'', merge). The embryo shown in H-H'' just after injection is also shown in I-I'' at 27 hpf. It contains many cells in the depth of the dorsal retina (dr) and also in the hypothalamus (hyp). (K) Fate-map of the anterior neural plate in CF. Colour codes are the same as for SF. Light blue: contribution to the hypothalamus (hyp) \pm telencephalon. (L-N) CF embryos treated with 2 μ M SU5402 between 8 and 12 hpf have a restored ventral quadrant (L,M) comparable with a SF (N). (O) Quantification of the effect indicates a \sim 50% increase of the vq contribution to eye size in treated embryos versus controls. Out of the 16 SU-treated CF embryos, seven showed a normal vq (complete rescue like in 5M), four showed a small vq (partial rescue) and five were not rescued. Conversely, a small but significant decrease in the size of the lens was found. *** $P < 0.001$. Data are mean \pm s.e.m. ???

that anterior neural progenitors in CF receive high doses of proliferative signals and/or that a larger progenitor pool may be formed at this rostral level. As preliminary evidence in favour of this possibility, we have found a 33% increase in the number of proliferating cells in the olfactory bulbs of CF at 36 hpf after phospho-histone H3 staining, and we have observed that the CF adult telencephalon is larger anteriorly with bigger olfactory bulbs when compared with SF (see Fig. S4 in the [supplementary material](#)). Increasing these two major signalling pathways in CF therefore has pleiotropic outcomes on its forebrain morphogenesis (see also Menuet et al., 2007) (Fig. 6).

The *Fgf8* heterochrony in CF modulates anterior neural plate patterning and impacts eye morphogenesis

Anterior neural plate and eyefield patterning was analysed with two LIM-homeodomain factors, *Lhx2* and its paralogue *Lhx9*, as read-outs of the influence of Shh and Fgf signalling. We choose these markers because they are crucial eye-specification genes. *Lhx2* in particular is required for eye formation (Porter et al., 1997; Tetreault et al., 2009; Yun et al., 2009), and is a member of a small

gene network able to induce ectopic eyes (Zuber et al., 2003). We also found strong expression of *Lhx9* in the *Astyanax* 10 hpf neural plate, consistent with recently reported expression of this factor in the *Xenopus* eyefield (Atkinson-Leadbetter et al., 2009). Interestingly, *Lhx2* and *Lhx9* expression patterns differed between CF and SF at the level of the medial neural plate, precisely in spatial relationship with the zone of influence of midline signalling systems. *Lhx2/Lhx9* transcripts thus behave similarly to *Pax6* transcripts in CF (Strickler et al., 2001).

Are the differences in *Lhx2/Lhx9* patterns between CF and SF due to the heterochrony of *Fgf8* or to the heterotopy of *Shh*? The elements to consider when answering this question are as follows. (1) The expression difference in CF versus SF occurs much earlier for *Shh* than for *Fgf8*, suggesting that *Shh* expansion – itself probably driven by earlier events – is at the origin of the *Fgf8* signalling modifications in CF. Cyclopamine treatments on CF support this hypothesis. (2) Inhibition of Shh signalling abolishes *Fgf8* expression, and inhibition of Fgf signalling rescues *Lhx2/9* expression in the neural plate but also downregulates *Shh* expression in the hypothalamus, suggesting reciprocal interaction between *Shh* and *Fgf*, and epistatic relationships between Fgf and

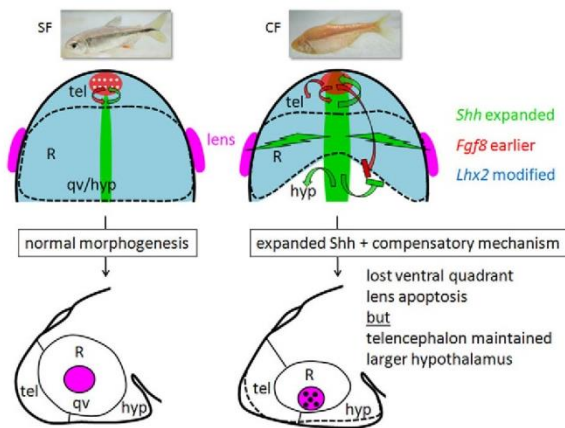


Fig. 6. Signalling and cell fate in the anterior plate in SF and CF embryos and their morphogenetic consequences. None of the regulatory interactions reported on this scheme were shown to be direct. In SF (left), normal expression of *Shh* (green) and *Fgf8* (red with dots) in time and space is followed by 'correct' anterior neural plate patterning, as seen through *Lhx2* (blue) expression and correct morphogenesis, in particular of a normal and complete eye with a retina (R), including a vq. In CF (right), expanded *Shh* has previously been shown to indirectly affect the lens (pink) and induce its apoptosis (black dots) (Yamamoto et al., 2004). Here, we show that increased *Shh* signalling leads to earlier expression of *Fgf8* (red without dots), a change that is probably responsible for the maintenance of a correct anterior forebrain (tel, telencephalon, horse-shoe shaped). However, it also leads to modifications of patterning and cell fate in the medial part of the neural plate, as deduced from *Lhx2* pattern and fate-mapping experiments that indicate a trade-off between ventral retina (vq) and hypothalamus (hyp) territories. These effects are consistent with our previous findings that the presumptive hypothalamus is enlarged in CF (Menuet et al., 2007; Rétaux et al., 2008) and with preliminary results indicating that the rostral-most telencephalon (olfactory bulbs) are more developed in CF (see Fig. S4 in the [supplementary material](#)).

Lhx genes between ~10 and 12 hpf. (3) Recent data showed that although *Fgf8* was thought to act downstream of *Shh* signalling, ectopic *Fgf8* downregulates *Lhx2* telencephalic expression in *Shh*-null mice, suggesting that Fgf signalling acts independently of *Shh* (Okada et al., 2008). In zebrafish, SU5402 treatments have shown that *Fgf8* is required for the initiation and maintenance of *Lhx2* expression, whereas using *Shh* pathway mutants has little effect on *Lhx2* expression (Seth et al., 2006). In *Xenopus*, Fgf signalling is necessary to initiate (but not to maintain) normal expression levels of *x-Lhx9* (Atkinson-Leadbetter et al., 2009). Altogether, these elements suggest that in *Astyanax*, although expanded *Shh* domain is the primary difference observed in CF, it is the *Fgf8* heterochrony that modifies *Lhx2/Lhx9* expression in the medial neural plate. Whether *Fgf8* acts directly or not on *Lhx* transcription is an important issue that remains to be determined.

We also bring experimental evidence in favour of the *Shh* expansion and the *Fgf8* heterochrony being (indirectly, through *Lhx* genes and modulation of the neural plate fate map) responsible for the loss of vq in the CF retina. The SU5402 treatments restoring both a *Lhx2* pattern and a retina morphology mimicking a SF, coupled to the fate-mapping experiments demonstrating that

posterior and medial cells of the anterior neural plate contribute to the vq in SF, strongly support this idea. In addition, fully consistent is the fact that the posterior medial cells of the anterior neural plate in CF contribute to the hypothalamus. In addition, a few cells injected in this area were later found in the telencephalon, a result that was never observed in SF. This suggests a 'trade-off' of prospective territories between vq and hypothalamus on the one hand, and between the retina and the telencephalon (as in *Rx3* mutants, see below) on the other hand, in CF embryos. Although the two assays cannot be performed on the same embryos for definitive proof, we propose that the rescue of the vq in SU-treated CF is due to the restoration of a normal, SF-like *Lhx2* expression pattern at neural plate stage.

Whereas regulation in space is often given strong importance, the 'physiological' *Astyanax* CF model further emphasises how regulation in time is also crucial. Of note, the modalities of reciprocal signalling between cells expressing *Shh* and their neighbours expressing *Fgf8* are normal in CF, as suggested by the double in situ hybridisation showing strictly adjacent expression in both CF and SF. Moreover, at stages earlier than 10 hpf and later than 12 hpf, CF and SF display an identical *Fgf8* pattern (see Fig. S1C-E' in the supplementary material). It is therefore the 2-hour shift in *Fgf8* telencephalic expression that makes the difference. For the CF embryo, this 2-hour advancement happens to affect the vq negatively, but also importantly counteracts and compensates the *Shh*-expanded expression domain and increased signalling onto the rostral neural tube, allowing the CF to develop a normal telencephalon (Fig. 6).

Why do CF first develop eyes?

The fact that CF embryos first develop eyes has puzzled researchers because it appears like a useless dispense of energy. However, from an early neurodevelopmental point of view, it may have been expected. Previous fate-mapping of the zebrafish neural plate (England et al., 2006; Varga et al., 1999; Woo and Fraser, 1995) and the present iontophoresis experiments in *Astyanax* show that cells contributing to the retina and to the rest of the secondary prosencephalon (hypothalamus plus telencephalon) are fairly intermingled at early stages, rendering virtually impossible to develop a normal forebrain without contributing at the same time to the making of an eye. Thus, for a vertebrate embryo, it is probably a strong developmental constraint to make eyes in order to shape a correct forebrain. To our knowledge, there is no case of a viable vertebrate embryo that would never develop eyes. In this line, it is remarkable that 'eye genes' such as *Pax6* or *Lhx2* are also expressed in other parts of the presumptive prosencephalon at late gastrula/early neurula stages and strongly affect telencephalic development in addition to leading to eyeless phenotypes when they are mutated (Bulchand et al., 2001; Mangale et al., 2008; Monuki et al., 2001; Porter et al., 1997; Stoykova et al., 2000). *Rx3* is the only factor reported to segregate very early on the telencephalic and eyefield territories in zebrafish (Stigloher et al., 2006). However, the *Rx3* mutation, which leads to an enlarged telencephalon and a lack of retina, also has deleterious effects on the anterior hypothalamus, which is reduced or missing (Stigloher et al., 2006).

Conclusion

Using CF as an advantageous model, we show that tight temporal regulation of signalling systems during early embryogenesis has a crucial impact on the size and shape of a structure – the vq of the retina. We were able, through manipulation of Fgf signalling, to

restore this vq, which constitutes the neural plate-derived component of the CF eye defect. It is highly probable that the signalling modifications we describe here for Fgf8 will also impact the other, placode-derived component of the eye, the lens, as Shh does (Yamamoto and Jeffery, 2000; Yamamoto et al., 2004). Our results are in favour of the idea that several morphological traits have evolved in cavefish after modification of factors with pleiotropic effects (Menuet et al., 2007; Protas et al., 2006; Yamamoto et al., 2009). They also highlight the power of developmental heterochronies in the evolution of morphological characters.

Acknowledgements

Work supported by ANR-Neuro (Agence Nationale pour la Recherche) [Midline] and CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) to S.R. K.P. was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of Research and by Agence pour la Recherche sur le Cancer. We thank Stéphane Père for taking care of our *Astyanax* colony, Mickael Poidevin for assistance with qPCR, Aurélie Heuzé for technical support, Nadine Peyrieras for help and access to iontophoresis set-up, and an anonymous referee for his/her very insightful remarks.

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Supplementary material

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.054106/-/DC1>

References

- Alunni, A., Menuet, A., Candal, E., Penigault, J. B., Jeffery, W. R. and Rétaux, S. (2007). Developmental mechanisms for retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *J. Comp. Neurol.* **505**, 221-233.
- Atkinson-Leadbetter, K., Bertolesi, G. E., Johnston, J. A., Hehr, C. L. and McFarlane, S. (2009). FGF receptor dependent regulation of Lhx9 expression in the developing nervous system. *Dev. Dyn.* **238**, 367-375.
- Bulchand, S., Grove, E. A., Porter, F. D. and Tole, S. (2001). LIM-homeodomain gene Lhx2 regulates the formation of the cortical hem. *Mech. Dev.* **100**, 165-175.
- Chen, J. K., Taipale, J., Young, K. E., Maiti, T. and Beachy, P. A. (2002). Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14071-14076.
- Crossley, P. H., Martinez, S., Ohkubo, Y. and Rubenstein, J. L. (2001). Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* **108**, 183-206.
- Deyts, C., Candal, E., Joly, J. S. and Bourrat, F. (2005). An automated in situ hybridization screen in the Medaka to identify unknown neural genes. *Dev. Dyn.* **234**, 698-708.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A. and McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**, 1417-1430.
- England, S. J., Blanchard, G. B., Mahadevan, L. and Adams, R. J. (2006). A dynamic fate map of the forebrain shows how vertebrate eyes form and explains two causes of cyclopia. *Development* **133**, 4613-4617.
- Fukuchi-Shimogori, T. and Grove, E. A. (2001). Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science* **294**, 1071-1074.
- Gibert, Y., Bernard, L., Debais-Thibaud, M., Bourrat, F., Joly, J. S., Pottin, K., Meyer, A., Rétaux, S., Begemann, G. and Laudet, V. (2010). Formation of oral and pharyngeal dentition in teleosts depends on differential recruitment of retinoic acid signaling. *FASEB J.* **24**, 3298-3309.
- Hayhurst, M., Gore, B. B., Tessier-Lavigne, M. and McConnell, S. K. (2008). Ongoing sonic hedgehog signaling is required for dorsal midline formation in the developing forebrain. *Dev. Neurobiol.* **68**, 83-100.
- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M. and Wilson, S. (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* **35**, 255-265.
- Incardona, J. P., Gaffield, W., Kapur, R. P. and Roelink, H. (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* **125**, 3553-3562.
- Jeffery, W. R. (2001). Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Dev. Biol.* **231**, 1-12.
- Jeffery, W. R. (2005). Adaptive evolution of eye degeneration in the Mexican blind cavefish. *J. Hered.* **96**, 185-196.
- Jeffery, W. R. (2008). Emerging model systems in evo-devo: cavefish and microevolution of development. *Evol. Dev.* **10**, 265-272.
- Jeffery, W. R. (2009). Regressive evolution in *Astyanax* cavefish. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 25-47.
- Lee, K. J. and Jessell, T. M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 261-294.
- Liem, K. F., Jr, Tremml, G. and Jessell, T. M. (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* **91**, 127-138.
- Mangale, V. S., Hirokawa, K. E., Satyaki, P. R., Gokulchandran, N., Chikbire, S., Subramanian, L., Shetty, A. S., Martynoga, B., Paul, J., Mai, M. V. et al. (2008). Lhx2 selector activity specifies cortical identity and suppresses hippocampal organizer fate. *Science* **319**, 304-309.
- Menuet, A., Alunni, A., Joly, J. S., Jeffery, W. R. and Rétaux, S. (2007). Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development* **134**, 845-855.
- Miyake, A., Nakayama, Y., Konishi, M. and Itoh, N. (2005). Fgf19 regulated by Hh signaling is required for zebrafish forebrain development. *Dev. Biol.* **288**, 259-275.
- Mohammadi, M., McMahon, G., Sun, L., Tang, C., Hirth, P., Yeh, B. K., Hubbard, S. R. and Schlessinger, J. (1997). Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* **276**, 955-960.
- Monuki, E. S. (2007). The morphogen signaling network in forebrain development and holoprosencephaly. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 566-575.
- Monuki, E. S., Porter, F. D. and Walsh, C. A. (2001). Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway. *Neuron* **32**, 591-604.
- Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H. and Takada, S. (2002). Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev.* **16**, 548-553.
- Ohkubo, Y., Chiang, C. and Rubenstein, J. L. (2002). Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* **111**, 1-17.
- Okada, T., Okumura, Y., Motoyama, J. and Ogawa, M. (2008). FGF8 signaling patterns the telencephalic midline by regulating putative key factors of midline development. *Dev. Biol.* **320**, 92-101.
- Porter, F. D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S. S., Wassif, C., Huang, S. P., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J. S., Bodine, D. et al. (1997). Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* **124**, 2935-2944.
- Protas, M., Conrad, M., Gross, J. B., Tabin, C. and Borowsky, R. (2007). Regressive evolution in the Mexican cave tetra, *Astyanax mexicanus*. *Curr. Biol.* **17**, 452-454.
- Protas, M. E., Hersey, C., Kochanek, D., Zhou, Y., Wilkens, H., Jeffery, W. R., Zon, L. I., Borowsky, R. and Tabin, C. J. (2006). Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nat. Genet.* **38**, 107-111.
- Rétaux, S., Pottin, K. and Alunni, A. (2008). Shh and forebrain evolution in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *Biol. Cell* **100**, 139-147.
- Rose, F. L. and Mitchell, R. W. (1982). Comparative lipid values of epigeal and cave-adapted *Astyanax*. *Southwest. Nat.* **27**, 357-358.
- Salin, K., Voituren, Y., Mourin, J. and Hervant, F. (2010). Cave colonization without fasting capacities: an example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **156A**, 451-457.
- Seth, A., Culverwell, J., Walkowicz, M., Toro, S., Rick, J. M., Neuhaus, S. C., Varga, Z. M. and Karlstrom, R. O. (2006). *belladonna* (lhx2) is required for neural patterning and midline axon guidance in the zebrafish forebrain. *Development* **133**, 725-735.
- Shanmugalingam, S., Houart, C., Picker, A., Reifers, F., Macdonald, R., Barth, A., Griffin, K., Brand, M. and Wilson, S. W. (2000). *Ace*/Fgf8 is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon. *Development* **127**, 2549-2561.
- Shimamura, K. and Rubenstein, J. L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124**, 2709-2718.
- Shimogori, T., Banuchi, V., Ng, H. Y., Strauss, J. B. and Grove, E. A. (2004). Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. *Development* **131**, 5639-5647.
- Stigloher, C., Ninkovic, J., Laplante, M., Geling, A., Tannhauser, B., Topp, S., Kikuta, H., Becker, T. S., Houart, C. and Bally-Cuif, L. (2006). Segregation of telencephalic and eye-field identities inside the zebrafish forebrain territory is controlled by Rx3. *Development* **133**, 2925-2935.
- Storm, E. E., Garel, S., Borello, U., Hebert, J. M., Martinez, S., McConnell, S. K., Martin, G. R. and Rubenstein, J. L. (2006). Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development* **133**, 1831-1844.

- Stoykova, A., Treichel, D., Hallonet, M. and Gruss, P. (2000). Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J. Neurosci.* **20**, 8042-8050.
- Strickler, A. G., Yamamoto, Y. and Jeffery, W. R. (2001). Early and late changes in Pax6 expression accompany eye degeneration during cavefish development. *Dev. Genes Evol.* **211**, 138-144.
- Strickler, A. G., Yamamoto, Y. and Jeffery, W. R. (2007). The lens controls cell survival in the retina: Evidence from the blind cavefish *Astyanax*. *Dev. Biol.* **311**, 512-523.
- Tetreault, N., Champagne, M. P. and Bernier, G. (2009). The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation. *Dev. Biol.* **327**, 541-550.
- Toro, S. and Varga, Z. M. (2007). Equivalent progenitor cells in the zebrafish anterior preplacodal field give rise to adenohypophysis, lens, and olfactory placodes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 534-542.
- Varatharasan, N., Croll, R. P. and Franz-Odenaal, T. (2009). Taste bud development and patterning in sighted and blind morphs of *Astyanax mexicanus*. *Dev. Dyn.* **238**, 3056-3064.
- Varga, Z. M., Wegner, J. and Westerfield, M. (1999). Anterior movement of ventral diencephalic precursors separates the primordial eye field in the neural plate and requires cyclops. *Development* **126**, 5533-5536.
- Vieira, C., Pombero, A., Garcia-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarria, D. and Martinez, S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 7-20.
- Walshe, J. and Mason, I. (2003). Unique and combinatorial functions of Fgf3 and Fgf8 during zebrafish forebrain development. *Development* **130**, 4337-4349.
- Westerfield, M. (2000). *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. Eugene, OR: University of Oregon Press.
- Wilkins, H. (2007). Regressive evolution: ontogeny and genetics of cavefish eye rudimentation. *Biol. J. Linn. Soc.* **92**, 287-296.
- Woo, K. and Fraser, S. E. (1995). Order and coherence in the fate map of the zebrafish nervous system. *Development* **121**, 2595-2609.
- Yamamoto, Y. and Jeffery, W. R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science* **289**, 631-633.
- Yamamoto, Y. and Jeffery, W. R. (2002). Probing teleost eye development by lens transplantation. *Methods* **28**, 420-426.
- Yamamoto, Y., Stock, D. W. and Jeffery, W. R. (2004). Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* **431**, 844-847.
- Yamamoto, Y., Byerly, M. S., Jackman, W. R. and Jeffery, W. R. (2009). Pleiotropic functions of embryonic sonic hedgehog expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Dev. Biol.* **330**, 200-211.
- Young, N. M., Chong, H. J., Hu, D., Hallgrímsson, B. and Marcucio, R. S. (2010). Quantitative analyses link modulation of sonic hedgehog signaling to continuous variation in facial growth and shape. *Development* **137**, 3405-3409.
- Yun, S., Saijoh, Y., Hirokawa, K. E., Kopinke, D., Murtaugh, L. C., Monuki, E. S. and Levine, E. M. (2009). Lhx2 links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. *Development* **136**, 3895-3906.
- Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G. and Harris, W. A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* **130**, 5155-5167.

B. Perte de l'agressivité chez les *Astyanax* CF

Article de Elipot et al., publié dans *Current Biology* en 2013.

Evolutionary Shift from Fighting to Foraging in Blind Cavefish through Changes in the Serotonin Network

**Yannick Elipot,¹ H       Hinaux,¹ Jacques Callebert,²
and Sylvie R      ^{1,*}**

¹Equipe Développement Evolution du Cerveau Antérieur,
UPR3294 Neurobiologie et Développement, CNRS, Institut
Alfred Fessard, 91198 Gif-sur-Yvette, France

²Service Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Lariboisière, 75475 Paris, France

Summary

Background: Within the species *Astyanax mexicanus*, there are several interfertile populations of river-dwelling sighted fish and cave-dwelling blind fish which have evolved morphological and behavioral adaptations, the origins of which are unknown. Here, we have investigated the neural, genetic, and developmental bases for the evolution of aggressive behavior in this teleost.

Results: We used an intruder-resident behavioral assay to compare aggressiveness quantitatively (attack counts) and qualitatively (pattern and nature of attacks) between the surface and cave populations of *Astyanax*. Using this paradigm, we characterize aggressive behavior in surface fish, bring support for the genetic component of this trait, and show that it is controlled by raphe serotonergic neurons and that it corresponds to the establishment of dominance between fish. Cavefish have completely lost such aggressive/dominance behavior. The few attacks performed by cavefish during the behavioral test instead correspond to food-seeking behavior, driven by the developmental evolution of their hypothalamic serotonergic paraventricular neurons, itself due to increased Sonic Hedgehog signaling during early forebrain embryogenesis.

Conclusions: We propose that during evolution and adaptation to their cave habitat, cavefish have undergone a behavioral shift, due to modifications of their serotonergic neuronal network. They have lost the typical aggressive behavior of surface fish and evolved a food-seeking behavior that is probably more advantageous to surviving in the dark. We have therefore demonstrated a link between the development of a neuronal network and the likely adaptive behaviors it controls.

Introduction

The Mexican tetra *Astyanax mexicanus* exists under two morphs: sighted river morphs inhabiting the streams of Mexico, and 29 populations of blind and depigmented cavefish morphs living in caves of the Sierra del Abra region, Mexico. Being from the same species and having diverged about one million years ago, these fish constitute an outstanding model for evolutionary biology [1, 2].

At first the cavefish eyes were thought to degenerate because they were useless in caves [3]. Then, it was proposed that eye and pigment loss was almost entirely the result of the

accumulation of morphologically reducing, selectively neutral mutations [4]. More recently, emphasis was given to the importance of selection on constructive traits and indirect effects on regressive traits, through mutations in pleiotropic developmental genes [5]. “Evo-devo” studies bring some support to the latter scenario. Actually, in addition to the loss of their eyes, cavefish have larger olfactory bulbs and hypothalamus [6], more taste buds, more teeth, larger jaws [7], and more neuromasts [8, 9]. Many of these anatomofunctional changes are due to embryonic modifications in morphogen signaling, namely Sonic Hedgehog (Shh) and Fibroblast Growth Factor (Fgf8) [10, 11]. These early signaling changes are indirectly responsible for lens apoptosis and thus eye degeneration [11], but they also induce the development of an enhanced gustatory apparatus [7], of larger olfactory epithelium and olfactory bulbs, and of a larger hypothalamus [6, 10]. It is likely, even though it is not yet demonstrated, that these changes in sensory and neuroendocrine systems are adaptive.

Cavefish and surface fish behavior is also very different, with important modifications concerning feeding and social behavior. Cavefish are bottom feeders and explore the substrate at a precise 45° angle [4]; they evolved a “vibration-attraction behavior” to locate food dropping onto the water surface [9]; they display modified swimming kinematics and a “wall-following” behavior to avoid collisions and explore their environment [12–14]; they have lost sleep, supposedly to increase wakefulness and chances to find food [15]; cavefish do well, in food competition experiments in the dark, whereas surface fish starve [16]; and cavefish have lost the aggressive behavior that is a trademark of their surface-fish counterparts [17–19]. These many and subtle behavioral adaptations are likely responsible for cavefish survival and success during cave colonization. They represent complex traits, due to many and subtle changes in specific brain regions.

We focused on the loss of aggressiveness in cavefish. We characterized aggressive behavior in the two *Astyanax* morphs, assessed its genetic basis, demonstrated the role of serotonin in the process, and investigated the developmental origin of the modifications in serotonergic network and behavior in cavefish.

Results

To compare aggressiveness in sighted surface fish (SF) and blind cavefish (CF) the classic “mirror test” is inappropriate. We used an “intruder assay” (see [Figure S1A](#) available online). Two fishes were habituated overnight in separate 200 ml tanks. The next morning, one fish was transferred into the tank of the other, and their behavior was immediately recorded for 1 hr.

Surface Fish and Cavefish Show Quantitative and Qualitative Differences in Aggressive Behavior

SF were ten times more aggressive than Pachón CF in the intruder assay (Figure 1A and Movies S1 and S2). During 1 hr, two SF attacked each other more than 1,000 times ($1,132 \pm 103$; $n = 57$), whereas two Pachón CF attacked each other about 100 times (110 ± 11 ; $n = 56$). This quantitative

*Correspondence: retaux@inaf.cnrs-qif.fr

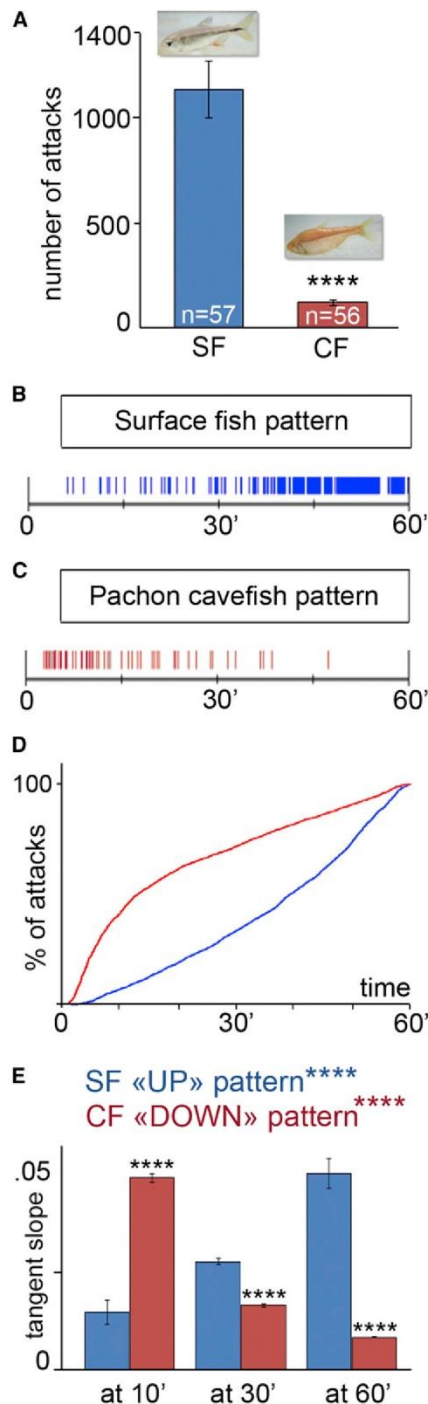


Figure 1. Characterization of Aggressive Behavior in Surface Fish and Its Loss in Blind Cavefish

(A) Number of attacks counted during 1 hr between two surface fish (SF, blue) or between two blind cavefish (CF, red). In this and following figures, the n given in colored bars indicates the number of tests performed (hence the number of animals tested is 2 n).

(B and C) Typical ODR graphs showing the distribution of attacks as a function of time along the 1 hr test in a SF (B, blue) and in a CF (C, red).

difference was accompanied by a qualitative difference in the pattern of attacks (Figures 1B and 1C). SF performed few attacks in the first 15 min, then became more aggressive and attacked with high frequency in the second half of the test (Figure 1B). Conversely, CF performed some attacks in the first 15–20 min and then swam quietly (Figure 1C). In order to assess the statistical significance of this difference in the pattern of attacks as a function of time, we used normalized cumulative curves and calculated the slopes of the tangents to these curves at three time points (10, 30, and 60 min; Figures 1D and S1B). The slopes of tangents therefore represent the frequency of attacks at a given moment of the test. The polynomial curves exhibited by SF resulted in a typical and significant “up” pattern for the slopes of tangents at the three time points (Figures 1D and 1E, blue), whereas the logarithmic curves exhibited by CF resulted in a typical and significant “down” pattern (Figures 1D and 1E, red). At the three time points examined, the slope values were different between SF and CF, showing that the pattern difference between the two *Astyanax* morphs is statistically significant. These results demonstrate that CF have lost most of the aggressive behavior that is a hallmark of their SF counterparts and that the “intruder assay” allows the detection of quantitative and qualitative behavioral differences.

Attacks in SF Are Not Visually Driven, but Are Facilitated by Vision

We next tested whether the lack of aggressive behavior in CF is due to their lack of vision.

First, we blinded SF early in development by bilateral removal of their eye lenses at 40 hpf (hours postfertilization). Such early surgical lens ablation mimics the CF condition, in which the apoptotic lens induces eye degeneration [18, 20, 21]. Lens-ablated SF presented degenerated eyes at 3 months (Figures 2A and 2B), and their optic tectum contralateral to the ablated eye was hypomorphic (Figure 2C) (see also [22]). Their visual sense was absent when tested in a fear-predator test (Movie S2). Blind, bilaterally lens-ablated SF performed fewer attacks than siblings that were not operated on (Figure 2D, green), but they still attacked significantly more than CF. Their pattern was “up” and indistinguishable from sighted SF controls (Figure 2E).

Second, the resident-intruder assays were conducted in the dark, using infrared recordings. In these conditions, SF (and CF) behaved exactly alike in the light, both in terms of attack counts and attack patterns (Figures 2D and 2E, dark blue/red). These data suggest that there is no requirement for vision in the expression of the SF aggressive behavior.

Loss of Aggressive Behavior in Independently Evolved Cavefish Populations

Parallel phenotypic diversification in closely related animals is a rigorous framework for testing the role of natural selection in

(D) Normalized cumulative attack counts expressed as a percentage of total attacks and as a function of time in SF (blue) and in CF (red).

(E) Slopes of the tangents of the cumulative curves in (D), respectively, taken at three time points during the test: 10, 30, and 60 min, in SF (blue, n = 57) and in CF (red, n = 56). For a detailed and complete description of the method used, see Figure S1. Asterisks indicate $p < 0.0001$ (Mann-Whitney) when comparing corresponding values in SF and CF.

In this and the following figures, asterisks indicate significant differences in attack counts (Mann-Whitney). The pattern indicated (“down,” “up,” or “flat”) for each condition was statistically tested (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney), and its p value is also given in asterisks.

Serotonin, Feeding, and Aggressiveness in *Astyanax*

3

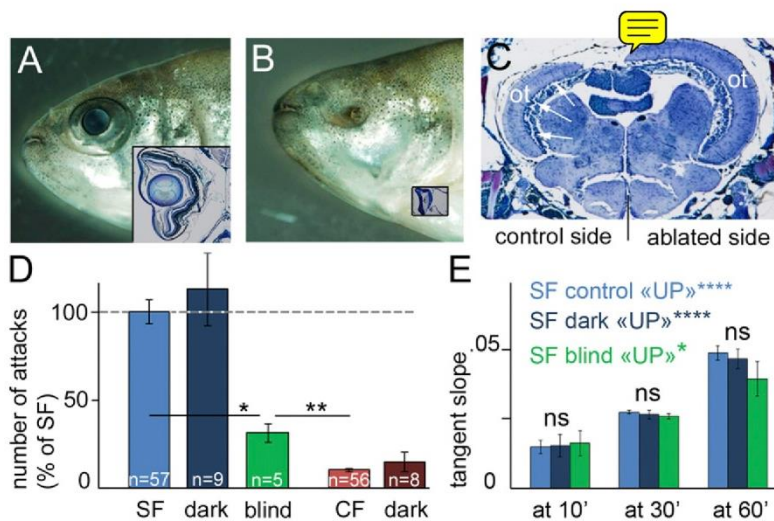


Figure 2. Aggressive Behavior in Lens-Ablated SF
(A and B) Photographs showing a normal SF eye and the eyeless phenotype in a 3-month-old SF which was lens-ablated at 40 hpf. Insets show toluidine blue counterstained sections of the normal and the degenerated vestigial eye, respectively.
(C) Section at the level of the optic tectum (ot) in a 3-month-old SF which was unilaterally lens ablated at 40 hpf. The contralateral ot (arrows) is severely reduced. See also Movie S3 for a functional visual test used to assess the blind phenotype of bilaterally lens-ablated SF. Paraffin sections were colored by Cresyl-Luxol method.
(D) Number of attacks counted during one hour between two SF (blue), two SF in the dark (dark blue), two blinded SF (green), two CF (red), or two CF in the dark (dark red) expressed as a percentage of SF attack number.
(E) Slopes of the tangents of the cumulative curves at 10, 30, and 60 min compared between SF (blue), SF in the dark (dark blue) and blind SF (green), allowing for comparison of the patterns of attacks. They are indistinguishable, all of the "up" SF type.

evolution [23]. We therefore analyzed the behavior of the Molino cavefish population, which is derived from a different ancestral stock than Pachón [24, 25]. Here, adult Molino fish were used because we are unable to breed the Molino population in the lab. Molino behavior was compared to the behavior of SF and Pachón adults, which was identical to the behavior of 3-month-old SF and Pachón fishes, respectively (compare Figures 1A and 1E, 3A and 3B). Molino performed few attacks, therefore behaving like Pachón (Figure 3A, orange). Their strikes were, however, uniformly distributed over the 1 hr test, resulting in identical attack frequencies along the test, and consequently in a "flat" pattern (Figure 3B).

Aggressive Behavior in SF and Its Loss in CF Are Genetically Encoded

The results above suggested that aggressiveness in SF and its loss in CF may be due to genetic differences, as previously suggested for the Piedras cavefish population [26]. We tested this hypothesis in two ways.

First, SF were grown at different population densities from the third day after hatching to the age of 3 months: either single (no physical/visual contact with other fish), or in groups of 30 or 300 individuals. Aggressiveness was quantitatively and qualitatively indistinguishable between the three types of husbandry (Figures 3C and 3D). Thus, a SF which has never seen another fish will "naturally" attack a congener.

Second, we generated F1 hybrids from several combinations of surface and cave populations. SFxCF F1 hybrids have slightly reduced eyes but are fully visual. They showed extreme aggressiveness (especially for ♀SF x ♂Molino) and displayed an "up" pattern (♀Pachón x ♂SF) or a "flat" pattern (♀SF x ♂Molino) (Figures 3E and 3F, green). This unanticipated finding suggests that aggressive behavior is a complex trait and may involve a heterosis effect in hybrids. Conversely, the ♀Pachón x ♂Molino cross resulted in blind F1 hybrids performing few attacks, like their parent cave populations, with a "flat" pattern, like Molino (Figures 3E and 3F, brown).

Altogether these data suggest that *Astyanax* aggressive behavior is genetically encoded, with SF alleles causing high aggressiveness, and that this trait has been repeatedly lost,

at least partly through the same genes, during the evolution of CF populations.

Aggressive Behavior in Surface Fish Is Linked to Serotonergic Neurotransmission

Serotonin (5HT) is notoriously linked to aggressive behavior in vertebrates, including fish [27–30]. We therefore investigated whether the 5HT neurotransmission was involved in SF attacks. We treated SF with fluoxetine [31], a selective serotonin reuptake inhibitor, or deprenyl [32], an inhibitor of monoamine oxidase (MAO, the serotonin-degrading enzyme; note, there is only one MAO in fish [33, 34]). Both compounds were expected to increase brain 5HT levels, although through completely different mechanisms (Figure 4A). Deprenyl efficiency was confirmed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) dosage: 5HT levels were increased 2.5 times in the brains of treated fish (Figure 4B, purple), and the levels of 5HIAA metabolite were strongly decreased as expected (–90% in SF; –84% in CF; $p < 0.001$). The effect of deprenyl was identical on SF and CF. Importantly, neither dopamine nor noradrenalin levels were modified (Figure S2B).

In the behavioral test, SF treated with varying concentrations of fluoxetine or with deprenyl showed a dose-dependent decrease in the number of attacks (Figure 4C, orange/purple), showing that aggressiveness and brain 5HT levels are inversely correlated in SF. However, SF with pharmacologically induced high 5HT levels were still significantly more aggressive than CF. Importantly, the decrease in SF aggressiveness after pharmacological treatment was not due to a modification of swimming behavior/locomotion (Figure S2A).

The pattern of attacks was also modified in SF after pharmacological treatments (Figure 4D). Fluoxetine-treated SF showed a Pachón-like, "down" pattern, with attack frequencies identical to control CF values at 10 and 60 min. After deprenyl, the "up" pattern was abolished, and the frequency of attacks was highly variable at the end of the test. These data demonstrate that interfering with 5HT neurotransmission modifies both quantitative and qualitative aspects of aggressiveness in SF, in a manner that tends to phenocopy the CF type of behavior.

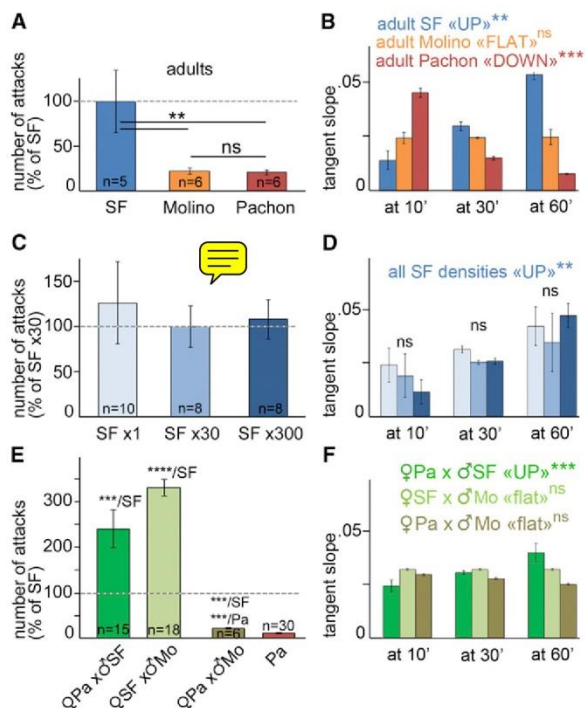


Figure 3. Aggressive Behavior in SF and Its Loss in CF Are Genetically Encoded

(A, C, and E) Number of attacks counted during 1 hr between two adult fish from different cave populations (A: SF, blue; Molino, orange; Pachon, red), between two 3-month-old SF raised at varying population densities (C: alone, light blue; by group of 30 as per usual, blue; by group of 300, dark blue), or between two 3-month-old fish from various F1 hybrid combinations (E: green and brown), and the number is expressed as a percentage of SF attack numbers. (B, D, and F) Slopes of the tangents of the cumulative curves at 10, 30, and 60 min corresponding to experimental conditions in (A), (C), and (E), respectively, and allowing for comparison of the patterns of attacks (same color codes as in A, C, and E).

Finally, aggressive behavior was tested in Pachón CF with increased 5HT levels. Fluoxetine but not deprenyl increased the number of attacks when compared to control CF (Figure 4E). Qualitatively, the two drugs had the same slight effect on the pattern of attacks, i.e., a lengthening of the aggressive period, resulting in a significantly attenuated “down” pattern (Figure 4F). Thus, in cavefish, interfering with 5HT neurotransmission has moderate effects on aggressive behavior.

Attacks in SF and CF Are Not Equivalent

Because the pattern of attacks was both population and serotonin dependent, we asked about the significance of this pattern difference between the two morphs.

We hypothesized that CF attacks, occurring during the first minutes of the test, may correspond to food-seeking behavior. Indeed, these blind animals may interpret the vibrations induced by the other fish as potential food. The hypothesis is also supported by the fact that (1) sighted SF do not attack in the first minutes, (2) serotonin is known to regulate feeding and appetite, and (3) CF with increased 5HT levels have a slightly increased aggressive period.

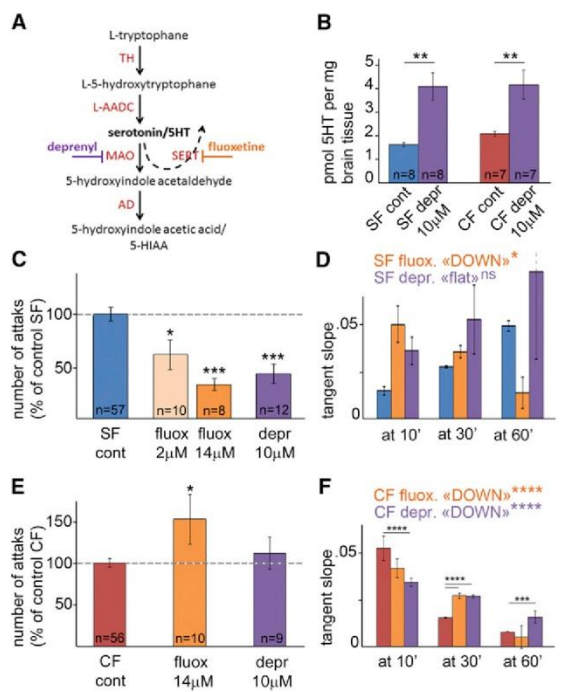


Figure 4. Aggressive Behavior in SF Is Linked to Serotonergic Neurotransmission

(A) Schema of the serotonin synthesis, reuptake, and degradation pathway, indicating the level of action of the two compounds used. TH, tryptophan hydroxylase; L-AADC, L aromatic amino-acid decarboxylase; MAO, monoamine oxidase; SERT, serotonin transporter; AD, aldehyde dehydrogenase. (B) HPLC measurement of 5HT in dissected SF and CF brains in the indicated conditions. SF, blue; CF, red; deprenyl-treated, purple. (C and E) Number of attacks counted during 1 hr after pharmacological treatment in SF (C) and in CF (E) and expressed as a percentage of attack number in the control population. (D and F) Slopes of the tangents of the cumulative curves at 10, 30, and 60 min corresponding to experimental conditions in (C) and (E), respectively, and allowing for comparison of the patterns of attacks (same color codes as in C and E).

We raised three groups of fish under different diets during 3 weeks: they were fed normally, overfed, or starved. Cavefish aggressiveness was inversely correlated to food intake, with overfed CF attacking significantly less than starved CF (Figure 5A), a result consistent with the food-seeking hypothesis. The pattern of attacks was “down” in the three feeding conditions (Figure 5B), suggesting that CF attacks occurring early in the test and resulting in the typical Pachón “down” pattern correspond to food-seeking behavior.

The opposite result was found for SF, with attack counts positively correlated to food intake (Figure 5C). Whereas normally fed SF showed an “up” pattern, starved and overfed SF showed a “flat” pattern that was due to modified attack frequencies at 10 and 60 min (Figure 5D). This suggests that, in normal conditions, SF attacks do not correspond to food-seeking behavior. Only when SF are hungry do they slightly increase their attack frequency at the beginning of the test.

As SF start attacking after a 20–25 min period of observation, we hypothesized that their strikes may correspond to the establishment of hierarchy between the two fish. This is

Serotonin, Feeding, and Aggressiveness in *Astyanax*

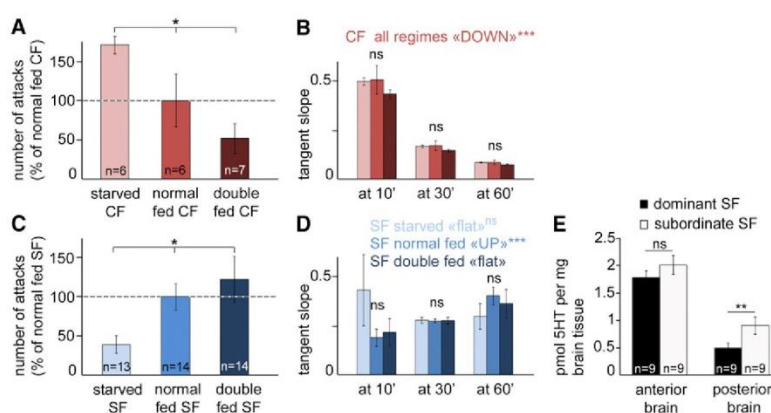


Figure 5. Aggressiveness, Feeding, and Hierarchy

(A and C) Number of attacks counted during one hour after 3 weeks of various diets in CF (A, different shades of red) and in SF (C, different shades of blue), and expressed as a percentage of attack numbers in the normal diet condition.

(B and D) Slopes of the tangents of the cumulative curves at 10, 30, and 60 min corresponding to experimental conditions in (A) and (C), respectively, and allowing for comparison of the patterns of attacks (same color codes).

(E) HPLC measurement of 5HT in the dissected brains of SF identified as dominant (black) or subordinate (white) in a group.

also supported by the fact that SF, but not CF, display schooling behavior (Figure S3; [35]). Because the typical “up” pattern of SF attacks is affected after 5HT pharmacological manipulations, we predicted that hierarchical order should be related to 5HT brain levels.

Groups of 12 SF were left together for 1 week, allowing for a hierarchical order to be firmly established in the school. The day of the experiment, careful 10–15 min observations unambiguously identified the highly dominant fish (one per tank) from the subordinate fish (two or three per tank). We measured the 5HT brain levels of dominant and subordinate fish by HPLC, after dissecting out the posterior part of the brain, which contains hindbrain raphe 5HT neurons, from the anterior part, which contains hypothalamic 5HT neuronal groups (see next section). Briefly, raphe 5HT neurons are involved in the control of mood and anxiety in mammals, whereas the hypothalamus is a neuroendocrine brain region controlling homeostatic functions. Dominant SF had lower 5HT levels than subordinate SF in their posterior brain, whereas anterior brain 5HT levels were identical in dominant/subordinate fish and thus independent from the hierarchical order (Figure 5E). This demonstrates that the dominant SF in a school undergoes an experience-dependent downregulation of its raphe 5HT levels. Together with the data showing that aggressiveness and 5HT levels are inversely correlated, this suggests that the typical “up” pattern of SF in the intruder test corresponds to attacks for establishment of dominance.

Altogether, these experiments suggest that SF attacks correspond to a social behavior (hierarchical order), whereas CF attacks correspond to a feeding behavior (foraging).

Comparing Cavefish and Surface Fish Serotonergic Systems

We next compared the neuroanatomical organization of the 5HT systems in SF and CF. Their overall organization of 5HT-positive neurons and fibers was similar to that described in other teleosts (Figures 6A and 6B; [34, 36]). The serotonergic neurons were located in the hindbrain raphe nucleus and in three hypothalamic nuclei corresponding to the anterior, intermediate, and posterior paraventricular nuclei (PVA/i/p), which are located along the third ventricle and its lateral and posterior recesses, respectively (Figures 6A–6G'). The 5HT neuronal patterns in SF and CF juveniles were identical. However, at all stages examined (1 week to 1 month) the PVA nucleus was larger in CF (Figures 6C, 6D, and S4A), both in terms of A-P extension (+37%; $p < 0.0001$) and surface area (Figure 6H),

suggesting that the PVA contained more neurons in CF than in SF. Accordingly, the fiber tract emanating from the PVA was thicker in CF (Figures 6G and 6G'). This difference was specific to the PVA nucleus, because the PVp and the raphe were of comparable sizes in the two morphs (Figure 6H).

This neuroanatomical difference was confirmed by HPLC measurement of 5HT in the dissected anterior part (hypothalamic neurons) and posterior part (raphe neurons) of SF and CF brains. The serotonin content was 45% higher in the fore-brain samples of CF, whereas the raphe samples were identical in the two morphs (Figure 6I). We thus attribute the difference between the hypothalamic samples of the two morphs to the larger PVA in CF. Moreover, we propose that CF attacks, occurring early in the behavioral test and corresponding to foraging, are driven by their larger PVA nucleus and higher PVA 5HT content.

Finally, it is worth noting that the average raphe 5HT level of SF randomly chosen in a tank is identical to that of subordinate SF, but higher than that of dominant SF ($p = 0.0047$; compare Figures 6I and 5E), consistent with a single fish being dominant in a school and with this fish undergoing a specific downregulation of 5HT content in its raphe nucleus.

Earlier Serotonergic Neurogenesis in Cavefish

To investigate the developmental origin of the size difference of the PVA nucleus between the two morphs, we performed a time course analysis of the appearance of 5HT neurons in embryos. *Astyanax* embryos develop very fast (a swimming larva hatches at 25 hpf), and CF and SF development is totally synchronous [37]. The first hypothalamic 5HT neurons were detectable as early as 18 hpf in CF (Figures 7A and 7B), whereas their SF homologs are never seen before 22–23 hpf (Figures 7C–7F). These neurons correspond to the future PVA neurons because they extend thick processes with flat end-feet toward the ventricular surface, a typical CSF-contacting cell morphology that is distinctive of this neuronal group (Figures 7E, 7F, and S4B). Thus, the difference in number of PVA 5HT neurons between the two *Astyanax* morphs can be traced back to the onset of serotonergic neurogenesis, which starts earlier in CF.

Contrary to PVA neurons, raphe 5HT neurons are first detected at the same stage in SF and CF, at around 20–21 hpf (Figures 7C and 7D). The same holds true for other steps of 5HT differentiation, such as the growth of axons or the innervation of the casquette (data not shown and [38]). Therefore, the specific difference in the 5HT hypothalamic PVA nucleus

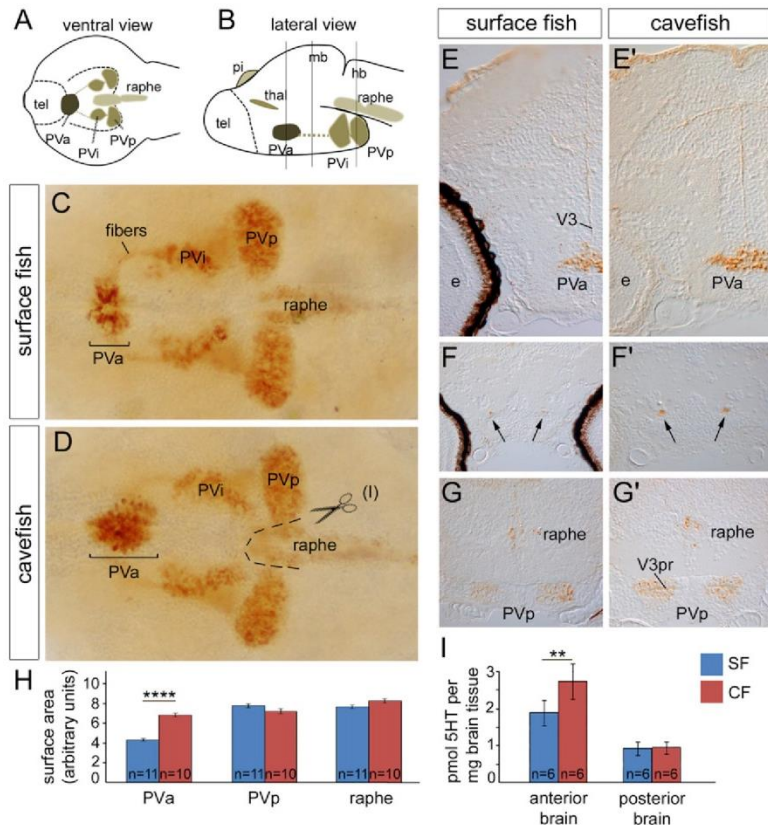


Figure 6. Comparative Anatomy of Serotonergic System in SF and CF

(A and B) Schemes showing the localization of 5HT neuronal cell bodies in the brain of *Astyanax mexicanus*, on a ventral (A) and a lateral (B) view. hb, hindbrain; mb, midbrain; pi, pineal gland; PVa, anterior paraventricular nucleus; PVi, intermediate paraventricular nucleus; PVp, posterior paraventricular nucleus; tel, telencephalon; thal, thalamus. Vertical lines in (B) indicate approximate section planes for panels (E), (F), and (G), respectively.

(C and D) Immunohistochemistry for 5HT on photomontages (because the different nuclei are not in the same focus) of in toto ventral views of dissected brains of 1-week-old SF (C) and CF (D). 5HT neuronal groups are indicated; compare to schemes (A) and (B). The dotted line/scissors in (D) indicate the dissection cut for HPLC measurements in (I) and in Figure 5E.

(E–G') Immunohistochemistry for 5HT on transverse sections from 1-week-old SF (left) and CF (right) heads. e, eye; V3 and V3pr, third ventricle and posterior recess. Arrows in (F) and (F') point to the fiber tract connecting Pva to posterior hypothalamus.

(H) Quantification of the size of 5HT neuronal groups in SF and CF. The surface area of the immunolabeled region was measured.

(I) HPLC measurement of 5HT in the anterior part and posterior part of the brain of SF (blue) and CF (red).

between CF and SF originates early in embryonic development, at a stage when the neuroepithelium is proliferating and when forebrain patterning and morphogenesis are largely incomplete.

Modifying 5HT Neurogenesis in Cavefish Modifies Their Behavior

Shh signaling is increased at the CF anterior midline during gastrulation/neurulation, indirectly causing the loss of eyes but also the formation of a larger hypothalamus [6, 10, 11]. To test whether precocious 5HT neurogenesis in the hypothalamus is influenced by stronger Shh signaling in CF, we treated CF embryos between 15 hpf and 24 hpf with cyclopamine, an inhibitor of Shh signaling [39, 40], and analyzed their 5HT system at 55 hpf. Cyclopamine treatment caused a dose-dependent developmental perturbation and reduction of the hypothalamic width (Figures 7G and S5), demonstrating the efficiency of Shh signaling inhibition. The treatment also reduced the surface area of both the PVa and the raphe (Figure 7G and S5), consistent with an effect of Shh signaling all along the neural tube ventral midline. Because cyclopamine 10 μ M strongly diminished the survival of larvae, we choose 5 μ M to treat embryos between 15 hpf and 24 hpf, and these were grown to 3 months and tested for behavior. Cyclopamine-treated CF performed 2.5 times more attacks than their ethanol-treated controls (Figure 7H). They presented an attenuated “down” pattern, (Figure 7I). We propose the following interpretation: Cyclopamine-treated CF have a “down” (representing food-seeking) pattern because their PVa size is

moderately reduced to 88% of the control CF value, and therefore they still search for food at the beginning of the test (the size of the SF PVa is only 63% the CF size). But the pattern is attenuated, due to more attacks in the second part of the test, because their raphe is smaller and contains less 5HT, mimicking the case of a dominant SF.

Discussion

We used varied experimental approaches to characterize aggressive behavior in *Astyanax* and to investigate the origin of its loss in cavefish populations. We demonstrated a link between the early development of a neuronal network and the possibly adaptive behaviors it controls. In addition, we deciphered the previously unknown functional roles of hypothalamic and hindbrain serotonergic neurons in a teleost. We propose that *Astyanax* raphe serotonergic neurons control social behavior, whereas hypothalamic serotonergic neurons control homeostatic functions.

Behavioral Analysis: Combining Attack Numbers and Patterns

Previous studies have reported the loss of aggressive behavior in *Astyanax* blind populations [17, 18, 26]. But these authors focused on the number of attacks, which were counted during short periods of time (10–15 min). Here, we have used longer behavioral observations and combined information given by attack counts and attack patterns. By doing so, we inferred that a SF attack does not have the same meaning as a CF attack. We propose to discriminate between the “true” attacks performed by SF, which underlie social dominance, and the

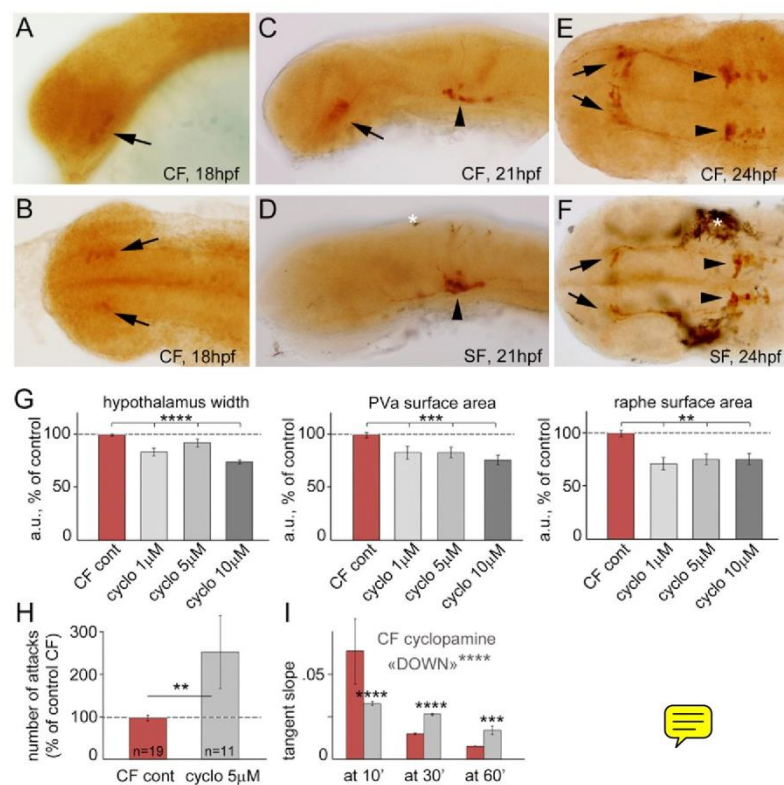


Figure 7. Developmental Evolution of the Serotonergic System in CF and Its Impact on Aggressiveness

(A–F) Immunohistochemistry for 5HT in toto on dissected embryonic brains at the indicated developmental stage. (A), (C), and (D) show lateral views, whereas (B), (E), and (F) show ventral views. Anterior is to the left. Arrows point to PVa neurons; arrowheads point to raphe neurons. Note that in SF at 21 hpf, raphe neurons but not PVa neurons are detected (D). White asterisks point to pigment cells in SF.

(G) Quantification of cyclopamine effect on the development of the hypothalamus (hypothalamus width, left) and 5HT neuronal nuclei (PVa nucleus, middle; raphe nucleus, right).

(H) Number of attacks counted during 1 hr in CF that had been treated with 5 μM cyclopamine between 15 hpf and 24 hpf (gray), expressed as a percentage of attack number in controls (red). (I) Slopes of the tangents of the cumulative curves at 10, 30, and 60 min corresponding to experimental conditions, respectively, and allowing for comparison of the patterns of attacks (same color codes as in H).

present in SF, a result that is strengthened by the conservation of the “up” pattern in this condition. The data from blinded SF and from SF in the dark are thus consistent with dominance aggressiveness not necessitating visual stimulation. The lateral line appears like a candidate sensory system to mediate this stimulation, a hypothesis that should be tested in the future.

“false” attacks performed by CF, which actually correspond to food-seeking attempts.

In contrast to our present findings, the Molino population was previously reported as an aggressive cavefish population [18]. Espinosa and colleagues had counted the number of attacks during a 10 min window, 30 min after putting the two fish together. According to our pattern analysis, during this particular 10 min window, Pachón cavefish perform almost no attacks, due to their typical “down” pattern, whereas Molino cavefish do perform some attacks, because they show a “flat” pattern. The apparent discrepancy between the two studies is therefore explained.

Vision Is Dispensable to Expressing Aggressive Behavior

Triggers for SF aggressive behavior were initially thought to be visual because aggression was reduced in the dark under certain conditions—although it was noted that “the attacks could be vehement in darkness, too” [17]. This view was first challenged after reporting that SF with degenerated eyes after embryonic lens extirpation presented intense aggressive behavior [18]. Here, with a larger experimental sample, we ascertained this tendency and were further able to study the aggressive pattern of these blinded animals, which is typical of a SF type. Moreover, with our protocol and contrarily to the findings of Burchard et al. [17], there was no reduction in SF aggressiveness in the dark. This is probably because our set-up corresponds to a test of territoriality: in *Astyanax*, there is an opposite behavioral “gradient” of territoriality versus schooling, as a function of available space for a group of fish [17]. We show that, even in the dark, dominance aggressiveness is

Functional Insights from Comparative Analysis of Behavior and Anatomy

We used CF as “natural mutants” and compared them to SF to study developmental evolution of the brain and the behaviors it governs in an adaptive context. Whereas the involvement of raphe neurons in aggressiveness and social behavior in mammals has long been reported [41], the respective functions of the raphe and hypothalamic serotonergic neurons in teleosts (the latter neurons do not exist in mammals) were previously unknown [42].

Concerning SF, the social nature of attacks is probably linked to the fact that these animals school. Even blinded SF tend to swim close to each other, and this is associated to an “up” pattern in the intruder test. These social-dominance-related attacks are controlled by the raphe, and aggressiveness is inversely correlated to raphe 5HT content. Indeed, when SF raphe 5HT levels are increased (pharmacologically) or decreased (in dominants), hierarchical attacks vary in an opposite manner. Even in CF, when the number of 5HT raphe neurons is experimentally reduced (cyclopamine), it seems possible to induce a small component of dominance-related aggressiveness. Across phyla, serotonin plays a significant role in dominance behavior [43–48]. Whether dominance is a cause or a consequence of the change in raphe 5HT neurotransmission and the mechanisms leading to these biochemical and behavioral changes is unclear. In mammals, the activity of raphe neurons is increased [49] and the expression of 5HT1A receptors is decreased [50] in subordinate

individuals, and knock-out mice for the 5HT transporter are inferior in obtaining the dominant position [51]. Consistently in *Astyanax*, we found a decrease in raphe 5HT and 5HIAA content in dominant SF. Whatever the mechanism for decreasing the activity of raphe serotonergic neurons in socially dominant individuals, this regulation seems shared among vertebrates. In the fighting fish [27, 52] and other fish [53], in rodents and primates including humans [41], correlations between 5HT neurotransmission and social aggressiveness are described, including polymorphisms in the MAO_A promoter described in humans with antagonistic behavior [54, 55].

In contrast to SF, blind CF do not school [35], although they probably possess the navigational abilities to do so. The “foraging” nature of their behavior in the intruder test is supported by the finding that overfed CF attack less than controls. However, overfed CF keep their “down” pattern, demonstrating that they do not try to establish hierarchy even in a high energy state. A possibility is that they cannot downregulate their raphe 5HT levels. Alternatively, ~~the idea that they may not use this regulation as dominance behavior~~ is tightly associated to social interactions. Only when their raphe nucleus is developmentally modified (by cyclopamine) do they perform a few dominance-like attacks. Further experiments will need to investigate whether 5HT neurotransmission in the PVa directly controls foraging behavior, or whether it does so by controlling the activity of nearby hypothalamic neurons containing neuropeptides such as NPY or POMC, which are master regulators of feeding behavior in all vertebrates [56, 57].

An Adaptive Value for Losing Aggressive Behavior in Cavefish?

The adaptive nature of the loss of aggressiveness in CF is not evident. One hypothesis was that CF populations in their natural habitat are small, decreasing the chances for two individuals to meet and reducing the stabilizing selection for agonistic behavior [17].

We propose that the loss of aggressiveness in cavefish is a “side effect” of the loss of schooling behavior, itself not selected in caves because predators are absent and because it is deleterious for efficient food finding in the dark. Moreover, 5HT network modifications control a behavioral gain for foraging, due to developmental evolution of their hypothalamic 5HT neurons. Apart from the reasoning that feeding in the dark is a major challenge for cavefish, several lines of evidence may suggest an adaptive nature for this behavioral shift.

- (1) When an organism is hungry, a probably frequent situation in caves, it employs behaviors to locate and ingest food while suppressing other behaviors. Insulin signaling coordinates behavioral output with changes in metabolism, NPY activates behaviors required for ingesting food, and serotonin modulates behaviors performed when an organism is satiated [58]. The hypothalamic modification observed in CF suggests that the selection pressure acted on the development of the 5HT system.
- (2) In food competition experiments in the dark, CF have a food-finding ability that is four times higher than SF, and in the wild SF incidentally washed into caves starve because they cannot compete with cavefish [16]. Thus, CF persistent food-seeking behavior increases survival in the dark.

(3) Aggression has been repeatedly lost in independently evolved natural cavefish populations (Pachón, Molino, Micos; see this work and [17, 18]). It will be important to analyze the 5HT system in several cavefish populations to assess whether the loss of aggressiveness/gain of foraging can be attributed to parallelism or to convergence, but it remains that this repeated evolution suggests that the behavioral change is advantageous. The results from CFxSF hybrids suggest that the trait is complex. The results from the Pachón x Molino cross suggest that the same gene(s) are involved in these two cave populations, although their different patterns of attacks suggest that partly different genes might be involved.

(4) CF underwent a loss of related collective behaviors (schooling, dominance). Because they navigate mainly with their lateral line sensory inputs, which also help them to locate food [9], isolated swimming probably provides them with a higher signal/noise ratio to their neuromasts, increasing their chances to find food. These chances are also increased by their continuous exploration of the environment, both as larvae [38] and as adults (Figure S3), and by their loss of sleep [15].

Midline-Induced Developmental Evolution in Cavefish?

Previous studies suggested a developmental modification of the ventral forebrain in CF compared to SF, due to changes in signaling centers secreting Shh and Fgf8 during embryogenesis [6, 10]. Here, we describe a developmental heterochrony of the appearance of the hypothalamic 5HT neurons in cavefish, potentially causing a longer period of 5HT neurogenesis and resulting in a larger size of the PVa nucleus. Conversely, the development of hindbrain raphe neurons is synchronous in the two morphs, and their mature raphe is of similar size. Whereas the roles of Shh and Fgf8 in the specification of mammalian raphe neurons is known [59–61], their roles in the specification of 5HT neurons in fish are unknown [42]. Our cyclopamine experiments show that fish raphe neurons develop in a conserved, Shh-dependent manner and demonstrate that fish hypothalamic 5HT neurogenesis is also controlled by Shh signaling.

Pet-1, an Ets-family transcription factor, is together with Lmx1b and Nkx2.2 a major player in the specification and differentiation of raphe neurons [59–61]. However, fish hypothalamic neurons do not express Pet-1 ([62]; H.H. and S.R., unpublished data, for *Astyanax*), suggesting that there are alternative developmental pathways to generate 5HT neurons in the diencephalon. Together with cyclopamine experiments, the fact that cavefish, with their increased Shh signaling in the embryonic hypothalamus [10], possess more 5HT neurons in the PVa suggests that Shh controls the yet unknown gene regulatory network leading to 5HT specification in the hypothalamus. Finally, the behavior of the Molino cavefish population (few attacks and “flat” pattern, interpreted as persistent foraging behavior) predicts that these animals will have an even larger PVa nucleus. Obtaining embryos from this population will be key to checking this prediction.

Using cavefish, we have unmasked a novel pleiotropic developmental effect of the modulation of embryonic signaling centers. In line with the hypothesis of the importance of selection on constructive traits and the indirect effects on regressive traits through mutations in pleiotropic developmental genes [5, 63], Shh hypersignaling in CF leads to eye loss,

and also to an increased oral (jaws and teeth) and sensory (taste buds) apparatus, as well as to subtle modifications in forebrain neuronal circuits, which have constructive behavioral consequences.

Experimental Procedures

Aggressive Behavior

Aggressive behavior was measured on ~3-month-old (minimum size: 1.5 cm) fish in a room at 25°C in lighted conditions. All fish were tested once. There was no sex difference in the behavior. Fish were isolated overnight in plastic boxes (12 × 9 × 5 cm) containing 200 ml of water (2 liters for adults). The next morning, "intruders" were transferred into the box of "resident" fish, and their interactions were recorded during 1 hr using a webcam (Logitech Quick Cam Pro9000). The two fish were always of the same population/treatment and similar size. Movies were analyzed manually using the ODR software (Observational Data Recorder, a gift from Samuel Péan, IFREMER, La Rochelle, France). An attack was defined as the charge of a fish and the escape of the other. In figures, the *n* numbers given in bars indicate the number of tests (hence the number of animals used is 2 *n*).

For experiments in darkness, fish were conditioned and tested in continuous darkness, using an infrared light table (Viewpoint) and a Dragonfly2 camera (Point Grey).

To analyze patterns of attacks, we used cumulative counts of attacks (clouds of points), expressed as a percentage of the total number of attacks in each test. Therefore, the maximum value of each cumulative cloud of points is 100%. The normalized attack frequency at a given time point thus corresponds to the slope of the tangent to the curve at this point. To determine the tangent function mathematically, we found the best fit to the cloud of point through regressions using Graph. We chose the best correlation coefficient (R^2) between linear, logarithmic, exponential power, and polynomial of order 2 regressions. The slopes of tangents at 10, 30, and 60 min of each test were calculated and used to compare the patterns (Figure S1B).

Statistical Analyses

The distribution of the data was not normal, even in cases of large samples (χ^2 or Shapiro-Wilk coupled to Kolmogorov-Smirnov). Therefore data were analyzed through nonparametric tests, using Statview. Mann-Whitney was used to compare samples two by two, and Kruskal-Wallis was used to compare more than two samples, dose responses, and aggressive patterns. Mann-Whitney was used after Kruskal-Wallis. Values are mean \pm SEM. Significance was set at $p < 0.05$ (*), **, ***, and **** correspond to $p < 0.01$, $p < 0.001$, and $p < 0.0001$, respectively.

Other methods are described in Supplemental Experimental Procedures.

Supplemental Information

Supplemental Information includes five figures, Supplemental Experimental Procedures, and three movies and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.044>.

Acknowledgments

This work was supported by an ANR grant (ASTYCO) to S.R. We thank Laurent Legendre for help in obtaining hybrids and for observations of dominant behavior, Samuel Péan for the ODR software, Stéphane Père and Magalie Bouvet for care of our *Astyanax* colony, Jonathan Bililowicz for proofreading English, and all group members for insightful discussions.

Received: July 18, 2012

Revised: September 27, 2012

Accepted: October 24, 2012

Published: November 15, 2012

References

- Jeffery, W.R. (2001). Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Dev. Biol.* 231, 1–12.
- Jeffery, W.R. (2009). Chapter 8. Evolution and development in the cavefish *Astyanax*. *Curr. Top. Dev. Biol.* 86, 191–221.
- Darwin, C. (1859). On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life, Chapter V (London: John Murray), p. 137.
- Wilkens, H. (1988). Evolution and genetics of epigeal and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the neutral mutation theory. In *Evolutionary Biology, Volume 23*, M.K. Hecht and B. Wallace, eds. (New York: Plenum), pp. 271–367.
- Jeffery, W.R. (2010). Pleiotropy and eye degeneration in cavefish. *Heredity (Edinb)* 105, 495–496.
- Menuet, A., Alunni, A., Joly, J.S., Jeffery, W.R., and Rétaux, S. (2007). Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development* 134, 845–855.
- Yamamoto, Y., Byerly, M.S., Jackman, W.R., and Jeffery, W.R. (2009). Pleiotropic functions of embryonic sonic hedgehog expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Dev. Biol.* 330, 200–211.
- Jeffery, W., Strickler, A., Guiney, S., Heyser, D., and Tomarev, S. (2000). Prox 1 in eye degeneration and sensory organ compensation during development and evolution of the cavefish *Astyanax*. *Dev. Genes Evol.* 210, 223–230.
- Yoshizawa, M., Goricki, S., Soares, D., and Jeffery, W.R. (2010). Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Curr. Biol.* 20, 1631–1636.
- Pottin, K., Hinaux, H., and Rétaux, S. (2011). Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* 138, 2467–2476.
- Yamamoto, Y., Stock, D.W., and Jeffery, W.R. (2004). Hedgehog signaling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* 431, 844–847.
- Sharma, S., Coombs, S., Patton, P., and Burt de Perera, T. (2009). The function of wall-following behaviors in the Mexican blind cavefish and a sighted relative, the Mexican tetra (*Astyanax*). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 195, 225–240.
- Windsor, S.P., Norris, S.E., Cameron, S.M., Mallinson, G.D., and Montgomery, J.C. (2010). The flow fields involved in hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). Part II: gliding parallel to a wall. *J. Exp. Biol.* 213, 3832–3842.
- Windsor, S.P., Tan, D., and Montgomery, J.C. (2008). Swimming kinematics and hydrodynamic imaging in the blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). *J. Exp. Biol.* 211, 2950–2959.
- Duboué, E.R., Keene, A.C., and Borowsky, R.L. (2011). Evolutionary convergence on sleep loss in cavefish populations. *Curr. Biol.* 21, 671–676.
- Hüppop, K. (1987). Food-finding ability in cave fish (*Astyanax fasciatus*). *Int. J. Speleol.* 16, 59–66.
- Burchards, H., Dölle, A., and Parzefall, J. (1985). Aggressive behavior of an epigeal population of *Astyanax mexicanus* and some observations on three subterranean populations. *Behav. Processes* 11, 225–235.
- Espinosa, L., Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2005). Non-optical releasers for aggressive behavior in blind and blinded *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Behav. Processes* 70, 144–148.
- Langecker, T.G., Neumann, B., Hausberg, C., and Parzefall, J. (1995). Evolution of the optical releasers for aggressive behavior in cave-dwelling *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). *Behav. Processes* 34, 161–167.
- Alunni, A., Menuet, A., Candal, E., Pénigault, J.B., Jeffery, W.R., and Rétaux, S. (2007). Developmental mechanisms for retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *J. Comp. Neurol.* 505, 221–233.
- Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science* 289, 631–633.
- Soares, D., Yamamoto, Y., Strickler, A.G., and Jeffery, W.R. (2004). The lens has a specific influence on optic nerve and tectum development in the blind cavefish *Astyanax*. *Dev. Neurosci.* 26, 308–317.
- Elmer, K.R., and Meyer, A. (2011). Adaptation in the age of ecological genomics: insights from parallelism and convergence. *Trends Ecol. Evol.* 26, 298–306.
- Bradic, M., Beerli, P., García-de León, F.J., Esquivel-Bobadilla, S., and Borowsky, R.L. (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evol. Biol.* 12, 9.
- Strecker, U., Faúndez, V.H., and Wilkens, H. (2004). Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 469–481.

26. Parzefall, J. (1985). On the heredity of behavior patterns in cave animals and their epigeal relatives. *Bulletin of the National Speleological Society* 47, 128–135.
27. Clotfelter, E.D., O'Hare, E.P., McNitt, M.M., Carpenter, R.E., and Summers, C.H. (2007). Serotonin decreases aggression via 5-HT1A receptors in the fighting fish *Betta splendens*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 87, 222–231.
28. Craig, I.W., and Halton, K.E. (2009). Genetics of human aggressive behaviour. *Hum. Genet.* 126, 101–113.
29. Popova, N.K. (2008). From gene to aggressive behavior: the role of brain serotonin. *Neurosci. Behav. Physiol.* 38, 471–475.
30. Winberg, S., Øverli, O., and Lepage, O. (2001). Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *J. Exp. Biol.* 204, 3867–3876.
31. Wong, D.T., Bymaster, F.P., and Engleman, E.A. (1995). Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci.* 57, 411–441.
32. Braestrup, C., Andersen, H., and Randrup, A. (1975). The monoamine oxidase B inhibitor deprenyl potentiates phenylethylamine behaviour in rats without inhibition of catecholamine metabolite formation. *Eur. J. Pharmacol.* 34, 181–187.
33. Anichtchik, O., Sallinen, V., Peitsaro, N., and Panula, P. (2006). Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 498, 593–610.
34. Sallinen, V., Sundvik, M., Reenilä, I., Peitsaro, N., Khrustal'ov, D., Anichtchik, O., Toilekyte, G., Kaslin, J., and Panula, P. (2009). Hyperserotonergic phenotype after monoamine oxidase inhibition in larval zebrafish. *J. Neurochem.* 109, 403–415.
35. Parzefall, J., and Senkel, S. (1986). Schooling behavior in caveicolous fish and their epigeal conspecifics. *Cong. Int. Espeleol.* 2, 107–109.
36. Ekström, P., and Van Veen, T. (1984). Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the brain of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. *J. Comp. Neurol.* 226, 307–320.
37. Hinaux, H., Pottin, K., Chalhoub, H., Pèze, S., Elipot, Y., Legendre, L., and Rétaux, S. (2011). A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and *Pachón* cavefish. *Zebrafish* 8, 155–165.
38. Pottin, K., Hyacinthe, C., and Rétaux, S. (2010). Conservation, development, and function of a cement gland-like structure in the fish *Astyanax mexicanus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 17256–17261.
39. Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., and Beachy, P.A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 16, 2743–2748.
40. Incardona, J.P., Gaffield, W., Kapur, R.P., and Roelink, H. (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* 125, 3553–3562.
41. Takahashi, A., Quadros, I.M., de Almeida, R.M., and Miczek, K.A. (2012). Behavioral and pharmacogenetics of aggressive behavior. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, J.F. Cryan and A. Reif, eds. (Heidelberg, Germany: Springer), pp. 73–138.
42. Lillesaar, C. (2011). The serotonergic system in fish. *J. Chem. Neuroanat.* 41, 294–308.
43. Edwards, D.H., and Spitzer, N. (2006). 6. Social dominance and serotonin receptor genes in crayfish. *Curr. Top. Dev. Biol.* 74, 177–199.
44. Fairbanks, L.A., Jorgensen, M.J., Huff, A., Blau, K., Hung, Y.Y., and Mann, J.J. (2004). Adolescent impulsivity predicts adult dominance attainment in male vervet monkeys. *Am. J. Primatol.* 64, 1–17.
45. Filby, A.L., Paull, G.C., Hickmore, T.F., and Tyler, C.R. (2010). Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC Genomics* 11, 498.
46. Korzan, W.J., and Summers, C.H. (2004). Serotonergic response to social stress and artificial social sign stimuli during paired interactions between male *Anolis carolinensis*. *Neuroscience* 123, 835–845.
47. Popova, N.K., Naumenko, V.S., Plyusina, I.Z., and Kulikov, A.V. (2005). Reduction in 5-HT1A receptor density, 5-HT1A mRNA expression, and functional correlates for 5-HT1A receptors in genetically defined aggressive rats. *J. Neurosci. Res.* 80, 286–292.
48. Larson, E.T., and Summers, C.H. (2001). Serotonin reverses dominant social status. *Behav. Brain Res.* 121, 95–102.
49. Paul, E.D., Hale, M.W., Lukkes, J.L., Valentine, M.J., Sarchet, D.M., and Lowry, C.A. (2011). Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Physiol. Behav.* 104, 272–282.
50. Cooper, M.A., Grober, M.S., Nicholas, C.R., and Huhman, K.L. (2009). Aggressive encounters alter the activation of serotonergic neurons and the expression of 5-HT1A mRNA in the hamster dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 161, 680–690.
51. Lewejohann, L., Kloke, V., Heimig, R.S., Jansen, F., Kaiser, S., Schmitt, A., Lesch, K.P., and Sachser, N. (2010). Social status and day-to-day behaviour of male serotonin transporter knockout mice. *Behav. Brain Res.* 211, 220–228.
52. Lynn, S.E., Egar, J.M., Walker, B.G., Sperry, T.S., and Ramenofsky, M. (2007). Fish on Prozac: a simple, noninvasive physiology laboratory investigating the mechanisms of aggressive behavior in *Betta splendens*. *Adv. Physiol. Educ.* 31, 358–363.
53. Perreault, H.A., Semsar, K., and Godwin, J. (2003). Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiol. Behav.* 79, 719–724.
54. Manuck, S.B., Flory, J.D., Ferrell, R.E., Mann, J.J., and Muldoon, M.F. (2000). A regulatory polymorphism of the monoamine oxidase-A gene may be associated with variability in aggression, impulsivity, and central nervous system serotonergic responsivity. *Psychiatry Res.* 95, 9–23.
55. Manuck, S.B., Flory, J.D., Muldoon, M.F., and Ferrell, R.E. (2002). Central nervous system serotonergic responsivity and aggressive disposition in men. *Physiol. Behav.* 77, 705–709.
56. Meister, B. (2007). Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol. Behav.* 92, 263–271.
57. Valassi, E., Scacchi, M., and Cavagnini, F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 18, 158–168.
58. Gruninger, T.R., LeBoeuf, B., Liu, Y., and Garcia, L.R. (2007). Molecular signaling involved in regulating feeding and other motivated behaviors. *Mol. Neurobiol.* 35, 1–20.
59. Alenina, N., Bashammakh, S., and Bader, M. (2006). Specification and differentiation of serotonergic neurons. *Stem Cell Rev.* 2, 5–10.
60. Deneris, E.S., and Wyler, S.C. (2012). Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. *Nat. Neurosci.* 15, 519–527.
61. Kiyasova, V., and Gaspar, P. (2011). Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1553–1562.
62. Lillesaar, C., Tannhäuser, B., Stigloher, C., Kremmer, E., and Bally-Cuif, L. (2007). The serotonergic phenotype is acquired by converging genetic mechanisms within the zebrafish central nervous system. *Dev. Dyn.* 236, 1072–1084.
63. Jeffery, W.R. (2005). Adaptive evolution of eye degeneration in the Mexican blind cavefish. *J. Hered.* 96, 185–196.

C.Sensibilité chimiosensorielle des *Astyanax* dans leur environnement naturel

Article de Bibliowicz, Alié et al., publié dans *EvoDevo* en 2013.

SHORT REPORT

Open Access

Differences in chemosensory response between eyed and eyeless *Astyanax mexicanus* of the Rio Subterráneo cave

Jonathan Bibliowicz^{1†}, Alexandre Alié^{1†}, Luis Espinasa², Masato Yoshizawa³, Maryline Blin¹, Hélène Hinaux¹, Laurent Legendre¹, Stéphane Père¹ and Sylvie Rétaux^{1*}

Abstract

Background: In blind cave-dwelling populations of *Astyanax mexicanus*, several morphological and behavioral shifts occurred during evolution in caves characterized by total and permanent darkness. Previous studies have shown that sensory systems such as the lateral line (mechanosensory) and taste buds (chemosensory) are modified in cavefish. It has long been hypothesized that another chemosensory modality, the olfactory system, might have evolved as well to provide an additional mechanism for food-searching in troglomorphic *Astyanax* populations.

Findings: During a March 2013 cave expedition to the Sierra de El Abra region of San Luis Potosí, Mexico, we tested chemosensory capabilities of the *Astyanax mexicanus* of the Rio Subterráneo cave. This cave hosts a hybrid population presenting a wide range of troglomorphic and epigean mixed phenotypes. During a behavioral test performed *in situ* in the cave, a striking correlation was observed between the absence of eyes and an increased attraction to food extract. In addition, eyeless troglomorphic fish possessed significantly larger naris size than their eyed, nontroglomorphic counterparts.

Conclusions: Our findings suggest that chemosensory capabilities might have evolved in cave-dwelling *Astyanax mexicanus* and that modulation of naris size might at least partially underlie this likely adaptive change.

Keywords: Behavior, Cavefish, Evolution, Hybrid population, Micos, Olfaction, Sensory system, Vision

Findings

Introduction

Cave-dwelling animals have long been recognized as excellent models for evolutionary biology [1]. Comparative studies of cave-dwelling (cavefish, CF) and surface-dwelling (surface fish, SF) morphs of the teleost fish *Astyanax mexicanus* have revealed several adaptations to life in dark cave environments [2-5], which have occurred during a few million years of evolution from a common SF-like ancestor [6]. In CF, temporal and spatial modulations in early developmental signaling pathways appear to influence brain development and organization [7-9]. Lateral line neuromasts on the head are more numerous and mediate a special mechanosensory behavior in response to vibrations on the

water surface [5]. Chemosensory structures are also modified, as CF possess a higher number of taste buds than their SF counterparts [4,10], and studies in a laboratory setting suggest that laboratory-raised CF originating from the Pachón cave might possess higher olfactory capabilities [11]. Thus, sensory modalities of CF might have evolved as an adaptation to life in dark caves for navigation, mate recognition and food-searching. However, the possibility that these changes might provide a sensory compensation for finding food in the dark has yet to be tested directly in natural cave environments.

Results

The Rio Subterráneo cave is located southwest of the Sierra de El Abra region in the Micos area of Mexico [12,13]. We visited this cave, which is inhabited by bats, in March 2013 (the dry season). We could document that the Subterráneo pools contain a wide array of

* Correspondence: retaux@inaf.cnrs-gif.fr

[†]Equal contributors

¹Equipe Développement Evolution du Cerveau Antérieur, UPR3294 N&D, CNRS, Institut Alfred Fessard, Gif-sur-Yvette F-91198, France

Full list of author information is available at the end of the article

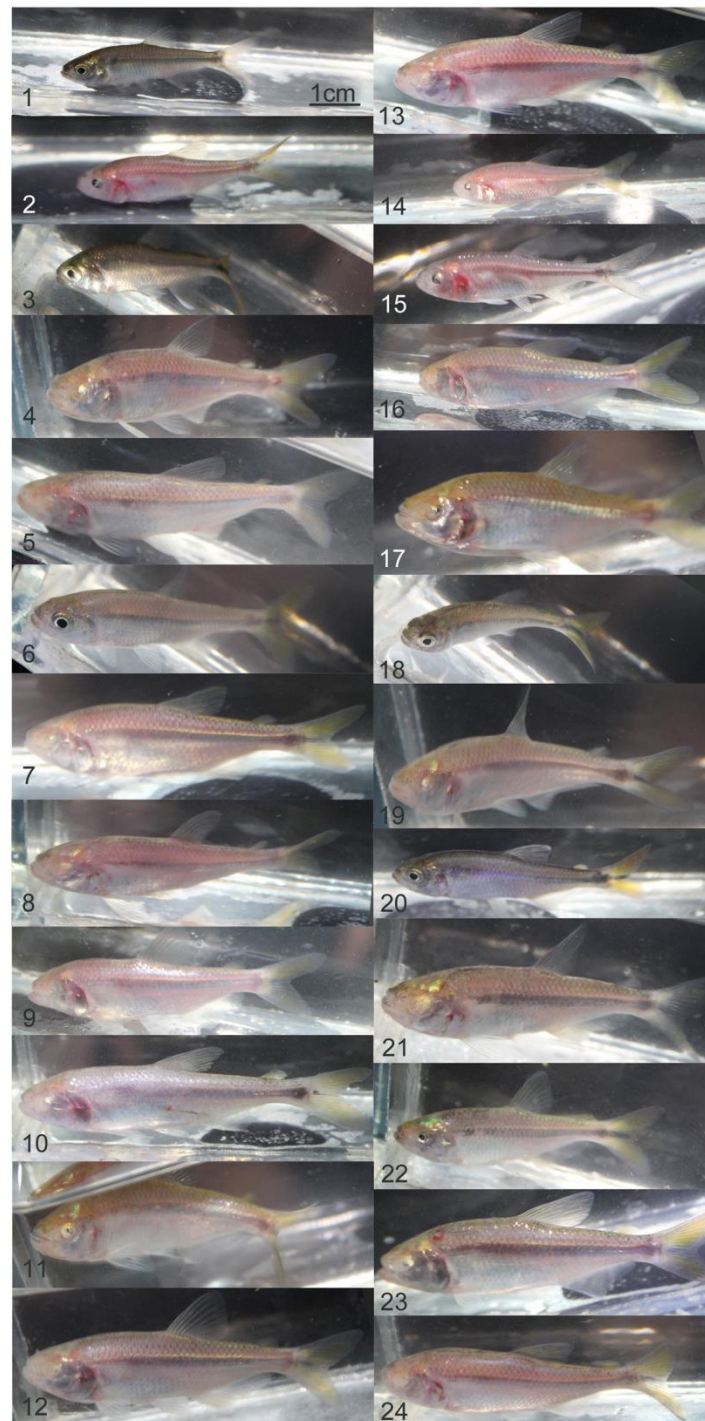


Figure 1 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 1 Subterrâneo pools contain a wide array of intermediate, hybrid phenotypes of *Astyanax mexicanus*. Photographs of our sample of 24 individuals fished with a seine net in the second pool of the Subterrâneo cave. Some fish are surface-like (1, 3 and 18; eyed and pigmented), some are totally troglomorphic (5, 7, 8, 9, 10, ...; eyeless and depigmented), some display mixed traits (2 and 15 are eyed and depigmented, whereas 21 is eyeless and pigmented) and some show intermediate phenotypes (for example, 17 with low pigmentation and very small eyes). Note that the pigmentation state of fish in a cave is not a good measure of its ability to make pigment cells; therefore, the various degrees of troglomorphy are best described by the size of the eyes, which is highly variable among these 24 individuals (for example, 1, 6, 18 and 20 have big eyes; 2, 3, 15 and 22 have small eyes; 11, 14, 17 and 19 have tiny eyes; and many are eyeless).

intermediate hybrid phenotypes that live alongside more troglomorphic fish (Figure 1). This is probably due to seasonal migration of SF into the Subterrâneo cave after flooding and subsequent introgression in the existing cave population [12,14,15]. This fact provides a rare possibility to simultaneously test the chemosensory behavior of several morphotypes corresponding to F2 hybrid individuals.

In this unique context, we set out to test the sensory-dependent food-finding capabilities of Subterrâneo fish. To be able to accurately test and quantify this behavior, we chose to collect a representative group of fish and performed our experiment in an enclosed area. The nine fish collected comprised both eyed and eyeless phenotypes, with eyeless fish being also mostly depigmented. The former were classified as SF-like and the latter as CF-like (Figure 2A). Using a specially designed behavioral testing system recently developed in our laboratory and infrared video recording equipment for filming in the dark, we were able to minimize any disturbances to the fish during the experiment. The fish were subjected to a choice test in which food extract was administered to one corner of an enclosed area and water (control) to the other corner (Figure 2B).

To quantify attraction of fish to the food extract, we analyzed the movie and counted the number of fish that were at the corner of the pool perfused with either the food extract or the water at 10-s intervals during the first minute of the test. Strikingly, the fish that were attracted were all CF-like (Figure 2C). They came to the food source within 20 s after extract administration, continuously swam toward and around the source, occasionally appearing to bite on the tube end (Additional file 1: movie online). They also displayed behavior very similar to the feeding behavior often seen in the laboratory, which includes increased activity combined with a typical feeding body position [16]. Although at any given time a few of the CF-like fish came at the extract-infused corner, each of them approached the odorant tube at some point during the test. They spent an average of 24 s in the extract-infused area, which was significantly more than the 1.8 s spent in the control area during the 1-min test ($P < 0.01$) (Figure 2D). Conversely, none of the SF-like fish approached the food extract corner throughout the test ($P < 0.01$ compared with CF-like fish). Photographs of individual fish taken after the test further revealed significantly larger naris size in CF-like individuals than in

SF-like individuals (Figure 3), reflecting an olfactory-related troglomorphic variation in the Subterrâneo population.

Our findings reveal an apparent correlation between troglomorphic characteristics and chemosensory-dependent feeding behavior in wild *Astyanax* fish of the Subterrâneo cave. Previous studies in a laboratory setting suggested that adult *Astyanax* Pachón cavefish are significantly better than their SF counterparts at finding food in the dark [17]. It has recently been suggested that one of the mechanisms that may contribute to this feeding success in cavefish is their ability to sense vibration using vibration attraction behavior (VAB), a behavior that is mediated through the mechanosensory function of their neuromasts [5]. Since vibrations should be equal on both food extract and control sides of our experimental setup, differences in VAB do not likely contribute to the attraction of CF-like individuals to the food extract that is absent in SF-like fish. Our findings suggest that modified chemosensory capabilities in cavefish do indeed provide a sensory compensation for food-searching in dark cave environments. The fact that heightened chemosensory capabilities has been observed in both laboratory-raised Pachón and wild Subterrâneo fish, which come from two independently derived stocks [14], also suggests a possible convergence of this capacity.

Furthermore, the fact that all food extract-responsive fish possessed enlarged nares and strongly reduced eyes shows a correlation between eye loss and modifications in olfactory-related morphology in this population. Although several mechanisms might underlie the observed heightened chemosensory capabilities in CF-like fish, modulations of naris size could be one contributing factor. Incidentally, our results also show that *Astyanax* can respond to a food extract to which they have never been exposed before (in this case, commercial granular fish food). The fact that only the CF-like individuals responded to this novel food might reflect a more generalist food detection ability of troglomorphic fish. If confirmed, such opportunism for multiple food sources might reflect a troglomorphic adaptation to an environment where seasonal water flows create sudden changes in nutrient provision.

Conclusions

To the best of our knowledge, this report is the first report to describe a behavioral experiment performed on

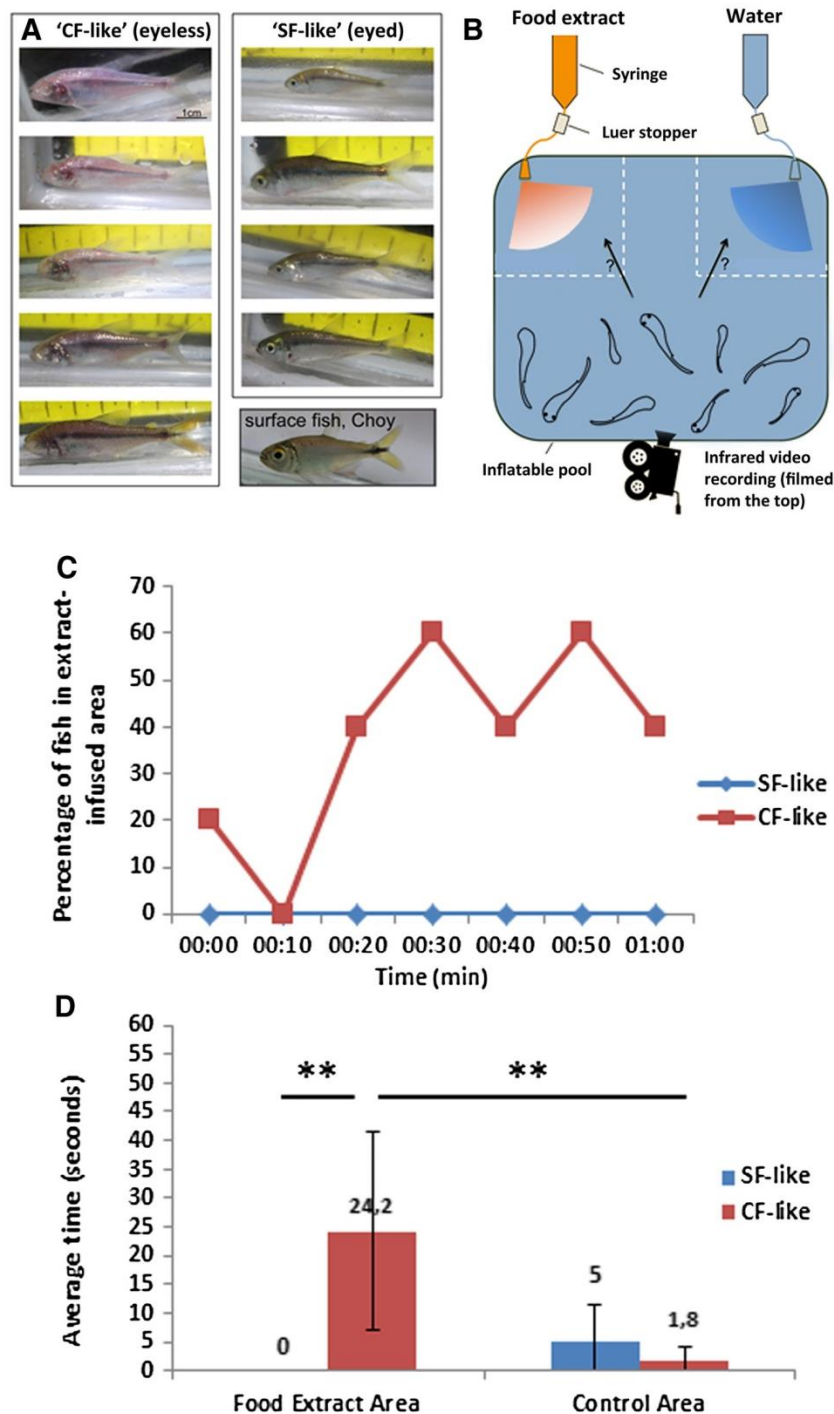


Figure 2 Behavioral responses to food extract in Subterraneo fish. (A) Both cavefish (CF)-like troglomorphic and surface fish (SF)-like nontroglomorphic fish were used for the behavioral test. On the bottom right, a SF from the Nacimiento del Río Choy is shown for comparison. (B) Schematic of experimental setup. See Methods for details. (C) Percentage of SF-like and CF-like fish that were in the food extract-infused quadrant of the pool after solution administration (10-s intervals). (D) Average time (in seconds) spent by SF-like and CF-like fish in either extract-infused or control area (** $P < 0.01$; CF-like = 5, SF-like = 4). Error bars represent standard deviations; indicated numbers correspond to average values.

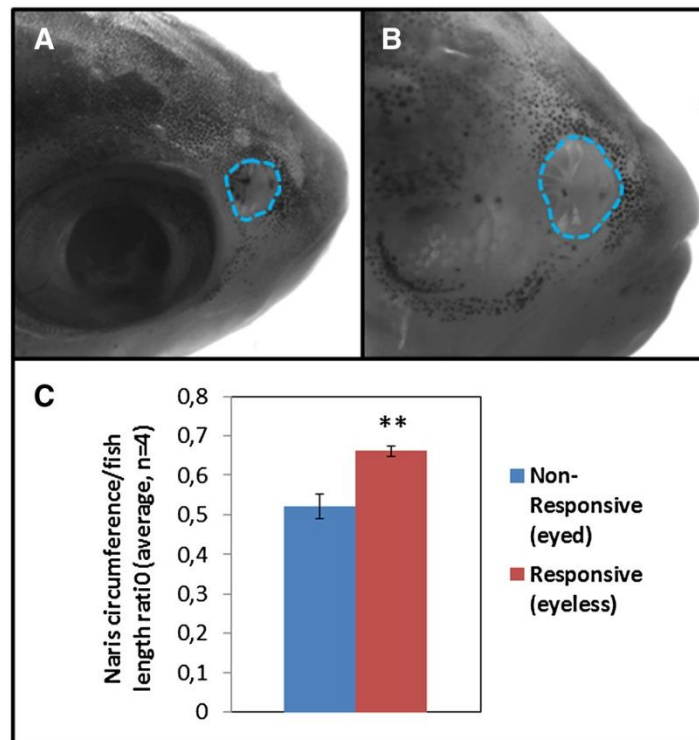


Figure 3 Naris size is correlated with eye loss and behavioral attraction to food extract. Measurements of naris circumference (dashed blue encircled areas) on individuals used for behavioral analysis revealed smaller naris size in surface fish-like fish (A) than in cavefish-like (B) after adjustment to fish body length (C) ($n = 4$, $P < 0.01$).

wild *Astyanax* in their natural environment. The results obtained raise the intriguing possibility that olfactory capabilities might have evolved in cave-dwelling *Astyanax*, and it is tempting to propose that this change improves food-finding in dark environments, where vision is useless. Additional studies are certainly necessary to better characterize the observed differences in chemosensory response and to test whether they correspond to bona fide sensory adaptations in *Astyanax mexicanus* (and potentially other cave-dwelling animals as well).

Methods

Sampling and photography

For assessment of the phenotypes encountered in the Subterráneo cave, fish were caught with a seine net and transferred to inflatable plastic pools. They were individually photographed with a Canon EOS 650D camera (Canon U.S.A., Melville, NY, USA) in a narrow glass box and returned to the pool. Fieldwork was performed under the auspices of Mexican permit 02241/13 (to SR) delivered by Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Behavioral test

To collect fish for behavioral testing, a meat-baited minnow trap was set up overnight. The collected fish were placed in a 61-cm × 61-cm × 15-cm inflatable pool and were left for an acclimatization period of 48 h. Two 50-ml syringes were attached to a stationary tripod and connected to medical solution administration tubing containing a Luer stopper to control solution flow (Baxter, Thetford, UK). The ends of the two administration sets were attached to opposite corners of the plastic pool (Figure 2B). Food extract was prepared by adding 5 g of granular fish food (TetraDiskus; Tetra, Blacksburg, VA, USA) to 50 ml of local water, mixing, and filtering using glass micro-fiber filters (Whatman plc, Kent, UK) to remove any food particles. This solution was added to one syringe while a water control was added to the other. Solution flow from the food extract and control samples was initiated simultaneously, and the experiment was filmed from the top using a Sony DCR-SR200 Handycam camcorder equipped with NIGHTSHOT mode (Sony Electronics, San Diego, CA, USA). Food extract and control areas were defined arbitrarily as 20-cm × 20-cm zones adjacent to the two respective

tube ends. To measure the time each fish spent in the food extract area, individual fish were manually tracked through frame-by-frame analysis of the movie using VirtualDub and ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A Mann–Whitney *U* test was utilized to determine the statistical significance of the results. After the test, the fish were collected, photographed individually and returned to the pool.

Naris size measurements

Naris circumference and standard body length [18] were measured using ImageJ software and reported as a ratio to control for size variation between individuals.

Additional file

Additional file 1: Recording behavior in the Rio Subterráneo cave.

A one minute movie (infrared recording) shows attraction of "CF-like" but not "SF-like" fish to food-related odors. The "food" tubing is at the top left, and the "control water" tubing is at the top right of the plastic pool.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JB, AA, LE, MY, MB, HH, LL, SP and SR prepared for and performed field experimentation. AA performed the test and recorded the movie, alone, in the dark. JB and AA analyzed the data. JB, AA and SR wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Ernesto Maldonado for help in obtaining the Mexican field work permit and Didier Casane, Julien Furney and Karen Pottin for their help and enthusiasm during cave experimentation. This work was supported by ANR grants ASTYCO and BLINDTEST to SR. JB and AA receive ANR postdoctoral financial support.

Author details

¹Equipe Développement Evolution du Cerveau Antérieur, UPR3294 N&D, CNRS, Institut Alfred Fessard, Gif-sur-Yvette F-91198, France. ²School of Science, Marist College, Poughkeepsie, NY, USA. ³Department of Biology, University of Maryland, College Park, MD, USA.

Received: 1 July 2013 Accepted: 26 July 2013

Published: 4 September 2013

References

- Protas M, Jeffery WR: Evolution and development in cave animals: from fish to crustaceans. *Wiley Interdiscipl Rev* 2013, **1**:823–845.
- McCauley DW, Hixon E, Jeffery WR: Evolution of pigment cell regression in the cavefish *Astyanax*: a late step in melanogenesis. *Evol Dev* 2004, **6**:209–218.
- Sharma S, Coombs S, Patton P, Burt De Perera T: The function of wall-following behaviors in the Mexican blind cavefish and a sighted relative, the Mexican tetra (*Astyanax*). *J Comp Physiol Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 2009, **195**:225–240.
- Yamamoto Y, Byerly MS, Jackman WR, Jeffery WR: Pleiotropic functions of embryonic *sonic hedgehog* expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Dev Biol* 2009, **330**:200–211.
- Yoshizawa M, Goricki S, Soares D, Jeffery WR: Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Curr Biol* 2011, **20**:1631–1636.

- Gross JB: The complex origin of *Astyanax* cavefish. *BMC Evol Biol* 2012, **12**:105.
- Pottin K, Hinaux H, Rétaux S: Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the *Shh* and *Fgf8* forebrain organising centres. *Development* 2011, **138**:2467–2476.
- Rétaux S, Pottin K, Alunni A: *Shh* and forebrain evolution in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *Biol Cell* 2008, **100**:139–147.
- Yamamoto Y, Stock DW, Jeffery WR: Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* 2004, **431**:844–847.
- Varatharasan N, Croll RP, Franz-Odenaal T: Taste bud development and patterning in sighted and blind morphs of *Astyanax mexicanus*. *Dev Dyn* 2009, **238**:3056–3064.
- Protas M, Tabansky I, Conrad M, Gross JB, Vidal O, Tabin CJ, Borowsky R: Multi-trait evolution in a cave fish, *Astyanax mexicanus*. *Evol Dev* 2008, **10**:196–209.
- Mitchell RW, Russell WH, Elliott WR: Mexican eyeless characin fishes, genus *Astyanax*: environment, distribution, and evolution. *Spec Publ Mus Texas Tech Univ* 1977, **12**:1–89.
- Wilkens H, Burns RJ: A new *Anoptichthys* cave population (Characidae, Pisces). *Ann Spéleol* 1972, **27**:263–270.
- Bradic M, Beerli P, García-De León FJ, Esquivel-Bobadilla S, Borowsky RL: Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evol Biol* 2012, **12**:9.
- Strecker U, Hausdorf B, Wilkens H: Parallel speciation in *Astyanax* cave fish (Teleostei) in northern Mexico. *Mol Phylogenet Evol* 2012, **62**:62–70.
- Schemmel C: Studies on the genetics of feeding behaviour in the cave fish *Astyanax mexicanus* f. *Anoptichthys*: an example of apparent monofactorial inheritance by polygenes. *Z Tierpsychol* 1980, **53**:9–22.
- Hüppop K: Food-finding ability in cave fish (*Astyanax fasciatus*). *Int J Speleol* 1987, **16**:59–66.
- Hinaux H, Pottin K, Chalhoub H, Pèrè S, Elipot Y, Legendre L, Rétaux S: A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachón cavefish. *Zebrafish* 2011, **8**:155–165.

doi:10.1186/2041-9139-4-25

Cite this article as: Bibliowicz et al.: Differences in chemosensory response between eyed and eyeless *Astyanax mexicanus* of the Rio Subterráneo cave. *EvoDevo* 2013 **4**:25.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

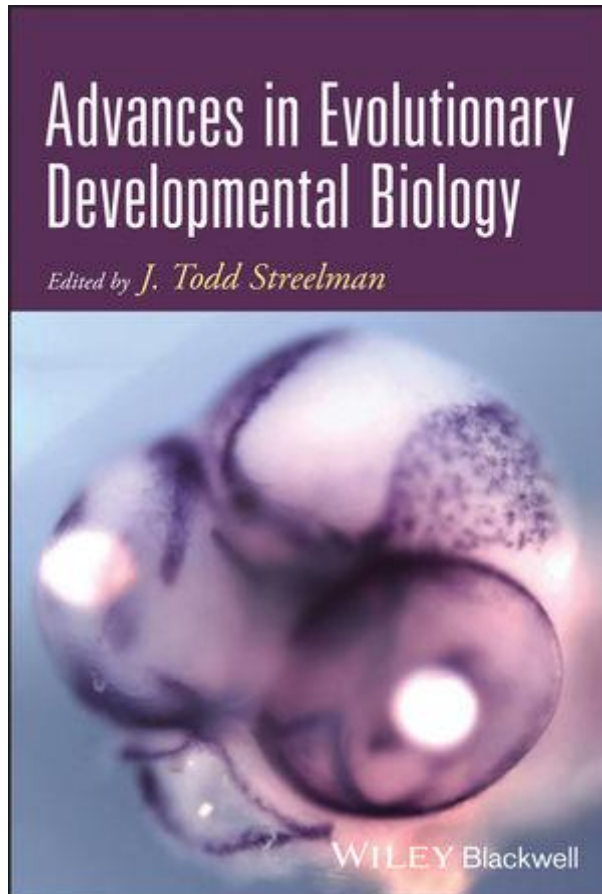
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



D. Revue sur l'évo-dévo du cerveau de Vertébré

Chapitre du livre *Advances in Evolutionary Developmental Biology* édité par J. Todd Streelman, paru en 2014.



Perspectives in Evo-Devo of the Vertebrate Brain

Sylvie Rétaux^{1#}, Franck Bourrat², Jean-Stéphane Joly², Hélène Hinaux¹

N&D UPR3294, Institut Alfred Fessard

¹ Development and Evolution of the Forebrain Group

² Morphogenesis of the Chordate Nervous System Group
CNRS, 91198 Gif sur Yvette, France.

Author for correspondence:

Sylvie Rétaux

N&D UPR3294, Institut Alfred Fessard

Group Development and Evolution of the Forebrain

CNRS, 91198 Gif sur Yvette, France.

(33) 1 69 82 34 52

retaux@inaf.cnrs-gif.fr

Table of content

Introduction	3
I- Emergence of the vertebrate forebrain in early chordates and its diversification	3
<i>The telencephalon is a vertebrate novelty</i>	4
<i>A major role for signaling centers in the emergence of the vertebrate brain</i>	5
<i>Evo-devo of signalling centres as drivers of forebrain micro-evolution</i>	7
II- Developmental control of the evolution of brain size and relative brain region size	9
<i>Evo-devo of proliferation in vertebrates</i>	9
<i>Evo-devo of progenitor types</i>	10
III- Evolution of <i>cis</i> -regulation of brain developmental genes	15
<i>Evolutionary conservation in cis-regulation</i>	16
<i>Evolutionary modifications in cis-regulation</i>	19
Conclusion	21

Introduction

The nervous system, and particularly the brain, is probably one of the most fascinating subjects for evolutionary biology. During the last century, neuroanatomists have compared adult brains, their sizes, their forms, their structures, their neuronal compositions, and their hodology. From the Golgi impregnations of Ramon y Cajal to the introduction of modern techniques of immunocytochemistry or molecular histology, the science of comparative neuroanatomy has accumulated evidence that the brains of vertebrates constitute an infinite collection of variations on a common theme. With the advent of the evolutionary developmental approach, the so-called “evo-devo”, in the 1980’90’, scientists started to search for the embryonic genetic mechanisms at the origin of both the unity and the variations described between brains. It was the time to compare between embryonic brains the expression patterns of dozens of patterning and regionalization genes, and to define models or frameworks in order to interpret these patterns in diverse species. The global picture that came out of these studies was that the brains of vertebrates are built along an amazingly identical plan during embryogenesis, therefore emphasizing the unity among them. This aspect has been reviewed elsewhere and will not be dealt with here in detail. Rather, we will mainly discuss the developmental mechanisms which, within a common *Bauplan*, allow for variations in brain anatomy. We have identified several “nodes” at which, within a common *Bauplan* to build a vertebrate type of brain, developmental evolution can shape differences. These critical points include the control of early signaling systems, the tight regulation of proliferation, and the emergence of new progenitor types in the embryonic neuroepithelia.

I- Emergence of the vertebrate forebrain in early chordates and its diversification.

The vertebrate forebrain is composed of the telencephalon (including the pallium or cortex and the subpallium or basal ganglia) and the diencephalon (including the thalamus and hypothalamus) (**Fig.1**). During embryogenesis, the forebrain is generated from the anterior-most part of the neural plate and neural tube through complex morphogenetic events. Meanwhile, waves of tightly controlled proliferation, neurogenesis, specification, migration, and axonal outgrowth generate thousands of types of neurones that are cytoarchitectonically organized and topographically interconnected (for reviews(Guillemot, 2005; Wilson and Rubenstein, 2000). Among vertebrates, the forebrain is also the part of the brain that has undergone the most dramatic morphological and anatomical diversification, this being particularly true when considering the most rostral and dorsal (alar) part, the telencephalon. At first sight, it is not obvious for instance that the mammalian cerebral cortex with its well-known organization in six layers is homologous to the everted dorsal pallium of teleost fishes.

The telencephalon is a vertebrate novelty.

Ten to fifteen years of “evo-devo” studies using comparative expression pattern analysis for developmental genes have shown that the forebrain, including the telencephalon of various vertebrate species, is specified and built according to shared genetic mechanisms (e.g., (Bachy et al., 2002; Puellas et al., 2000). For example, the telencephalon of all vertebrates, including

jawless vertebrates like lampreys, is built along a highly conserved *Pax6*-expressing pallium/*Dlx*-expressing subpallium scheme (**Fig.1**). By contrast, the sister group of vertebrates, the urochordates, represented by ascidians (Delsuc et al., 2006), together with the earlier-emerged group of cephalochordates, represented by amphioxus, do not possess a telencephalon. The anterior tip of their central nervous system is composed of a sensory vesicle (ascidians) or a cerebral vesicle (amphioxus)(**Fig.1**). When comparing the patterning of the anterior neural tube among the three groups of chordates, one observes similarities that are likely inherited from their common ancestor. For example, *Otx* expression is a hallmark of the anterior neural tube in all chordates (Wada et al., 1998) (grey lines on **Fig.1**). In the ascidian *Ciona intestinalis*, detailed patterning analysis has led to the proposal that the anterior ventral neural tube corresponds to the vertebrate presumptive hypothalamus (Moret et al., 2005), i.e., a diencephalic, but not telencephalic, region of the brain. In the amphioxus as well, regional identity gene expression suggests a homology between the amphioxus cerebral vesicle and the vertebrate diencephalic forebrain (Holland and Short, 2008; Venkatesh et al., 1999). One of the observations that guided these conclusions is the expression pattern of *Nkx2.1* (yellow on **Fig.1**), a gene which is considered as a determinant of hypothalamic regional identity.

The telencephalon therefore appears to be a vertebrate novelty (or synapomorphy). In this context, lampreys occupy a crucial phylogenetic position in the chordate tree to study the emergence of the telencephalon: they belong to agnathans (=no jaw) or cyclostomes (=round mouth), the sister group of jawed vertebrates (Osorio and Retaux, 2008). Any character that is shared by lampreys and other vertebrates but not by urochordates or cephalochordates is therefore potentially relevant for the description of the common ancestor of all vertebrates. Studying them, we may be able to partly reconstitute what has happened about 500 MYA, when this common ancestor experienced the emergence and swelling of a part of the nervous system at the tip of its dorsal (alar) neural tube: a telencephalon.

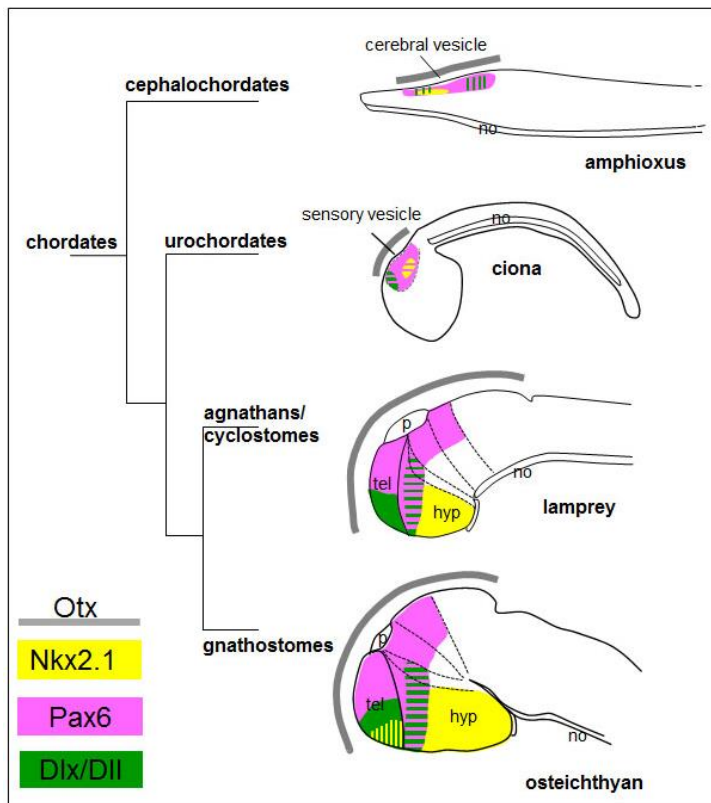


Figure 1: Emergence of the vertebrate brain-patterning.

A simplified phylogenetic tree of chordates shows drawings of embryonic expression of *Otx*, *Nkx2.1*, *Pax6*, and *Dlx* genes (see color code) in representative species. Brains are drawn with anterior side to the left and dorsal side up. The drawing of amphioxus is compiled from data in (Gardon et al., 1998; Holland et al., 1996; Venkatesh et al., 1999). The drawing of *Ciona* is compiled from data from the aniseed database and (Mazet et al., 2003; Moret et al., 2005). The drawing of the lamprey is adapted from (Murakami et al., 2001; Osorio et al., 2005; Tomsa and Langeland, 1999). The typical osteichthyan is represented by a zebrafish brain and is compiled from the ZFIN database. fp, floorplate; hb, hindbrain; hyp, hypothalamus; mhb, mid-hindbrain boundary; no, notochord; p, pineal gland; pcp, prechordal plate; tel, telencephalon; zli, *zona limitans intrathalamica*.

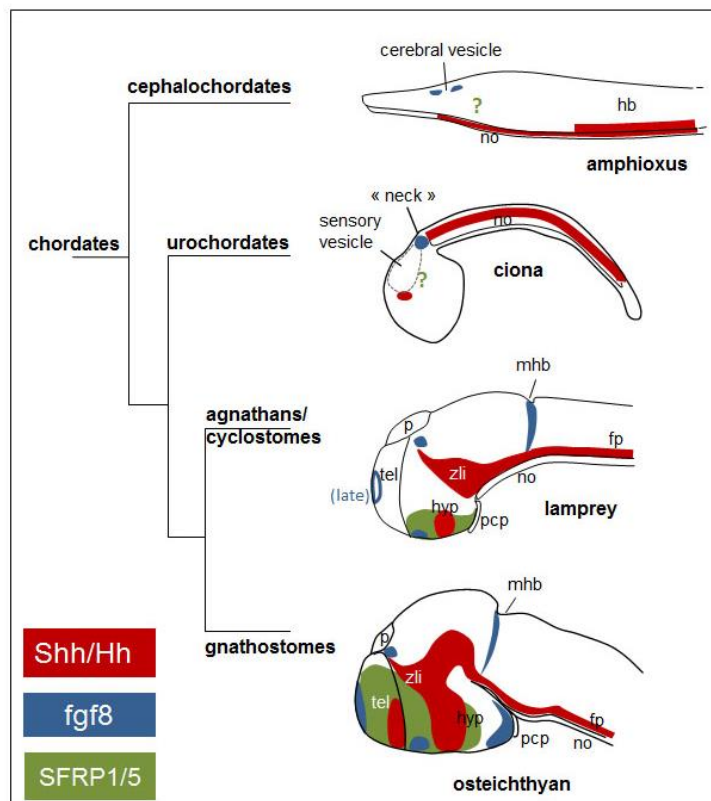


Figure 2: Emergence of the vertebrate brain-signaling centers.

Same simplified chordate tree as in Figure 1, showing expression patterns of *Shh*, *Fgf8* and *SFRP* antagonists (see color code). The drawing of amphioxus is compiled from data from (Lin et al., 2009; Onai et al., 2009; Shimeld, 1999; Shimeld et al., 2007). The drawing of *Ciona* is compiled from data from the aniseed database and (Imai et al., 2002; Imai et al., 2009; Takatori et al., 2002). The drawing of the lamprey is adapted from (Guerin et al., 2009; Osorio et al., 2005). The typical osteichthyan is represented by a zebrafish brain and is compiled from the ZFIN database. Same legends as in Fig.1.

A major role for signaling centers in the emergence of the vertebrate brain.

During embryogenesis, the brain develops under the influence of several signalling centres, sometimes called secondary organizers. These centres secrete diffusible molecules with morphogen properties, which control growth and patterning by generating a field of organization in the adjacent neuroepithelium (reviewed by (Vieira et al., 2010)). The morphogen gradients are interpreted into discrete neuroepithelial domains or divisions, which correspond to the future functional units of the mature brain. Therefore, any change in the time of appearance, in the strength, or in the exact location of such secondary organizers has the potential of significantly influencing the size or shape or patterning, in other words the neuroanatomy, of the brain region they “organize”.

A number of the signalling centres mentioned above are located at the embryonic midline. Ventrally, the notochord and prechordal plate (of mesodermal origin) and the induced floor plate of the neural tube secrete Sonic Hedgehog (*Shh*) (Echelard et al., 1993). At mid-embryogenesis, new areas of *Shh* expression appear in the forebrain, always emanating from the ventral midline: the *zona limitans intrathalamica* (*zli*) and the ventral telencephalon (Kiecker and Lumsden, 2004; Scholpp et al., 2006; Vieira and Martinez, 2006). Dorsally, the roof plate of the neural tube secretes molecules of the Wnt (Wingless-Int) (Lee and Jessell, 1999; Muromiyama et al., 2002) and Bmp (Bone Morphogenetic Protein) families (Liem et al., 1997). Wnt ligands are also secreted from the mid-diencephalon. Finally, at the rostral tip of the neural tube, the anterior neural ridge (ANR) and later the rostral telencephalon produce *Fgf8* (Fibroblast Growth Factor 8, also expressed at the mid-hindbrain organizer, or *mhb*) (Rubenstein et al., 1998; Shimamura and Rubenstein, 1997).

Classical evo-devo comparing in space and time the expression patterns of these morphogens among chordates reveals a striking tendency: a progressive anteriorization of the location of these growth-inducing and morphogen molecules along the neural tube (Fig.2). This holds true for all signaling system analyzed so far:

-Ventral *Hedgehog* expression (red in Fig.2) is restricted posteriorly in non-vertebrate chordates; in vertebrates *Shh* expression invades the diencephalon and forms a “novelty”, the *zli*, responsible for the emergence of a neuromeric, segmented, diencephalon (dotted lines in Fig.1); in gnathostomes *Shh* further invades the ventral telencephalon, where it probably drives the emergence of a new subpallial division: the *mge* (medial ganglionic eminence) or pallidum (expressing *Nkx2.1*, yellow on Fig.1).

-*Fgf8* expression (blue in Fig.2) is always confined to very restricted areas in the nervous system and like for *Shh*, new *Fgf8* expression domains invade the anterior CNS. In *Ciona*, *Fgf8* expression in the neck region (which also expresses *Pax2/5/8* and *engrailed*) was suggested to prefigure the *mhb* organizer, a novelty shared by all vertebrates. In the latter, novel additional *Fgf8* expression domains in the prosencephalon are probably related to the growth of hypothalamic and telencephalic brain regions. Interestingly, the late heterochronic appearance of the rostral-most *Fgf8* domain in lampreys may be related to the small size of their embryonic/early larval telencephalon.

-In vertebrates, strong Wnt signaling imposes diencephalic identity. Antagonizing such Wnt activity at the rostral pole of the neural tube, through expression of *SFRP* antagonists (Secreted Frizzled Related Proteins, green in Fig.2), may have allowed the developmental evolution of the telencephalon.

Altogether it appears that the evolution, in space and time, of the expression of signaling molecules may have been a motor for the emergence of the vertebrate forebrain. Of note, Pani and colleagues have recently described three “signaling centers” in the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii*, a non-chordate deuterostome. *Fgf*, *sfrp*, *hedgehog* and *wnt* are expressed in vertebrate-like arrangements in the hemichordate ectoderm, and homologous genetic mechanisms regulate ectodermal patterning in both animals. The authors proposed that these genetic programs were components of an unexpectedly complex, ancient genetic regulatory scaffold for deuterostome body patterning that degenerated in amphioxus and ascidians, but was retained to pattern divergent structures in hemichordates and vertebrates (Pani et al., 2012). Whereas the function of these molecules is reasonably well understood during development per se, there is still a gap to fill to prove functionally their significance during evolution. In the next section, we will discuss the consequences of subtle changes in the expression of these molecules for the fine-tuning of the relative size of brain regions in a micro-evolutionary perspective and adaptive context, and on models where a functional link is more easily established.

Evo-devo of signalling centres as drivers of forebrain micro-evolution

The classical view of brain diversification and variation in the relative sizes of brain regions implicates “late” events of proliferation and neurogenesis, rather than “early” patterning signals. However some examples now tend to illustrate that the latter case also occurred during evolution. As already discussed above, many developmental studies show the involvement of signaling molecules in the patterning of the brain, but examples in which variations of these molecules actually lead to evolutionary diversification of vertebrate brains are rare.

Studies on cichlid fishes from the Lake Malawi have given one such example. There, several hundreds of cichlid species are the result of an adaptive radiation, and they all specialized on different environments and feeding habits (Salzburger and Meyer, 2004), their brains adapting correspondingly. Rock-dwellers, living in complex environments, possess a larger telencephalon and a smaller thalamus than sand-dwellers whose environment is more homogenous. A study recently showed that the relative sizes of thalamus and telencephalon are influenced by a Wnt1 posteriorizing signal expressed from the midbrain-hindbrain boundary/mhb and a *Six3*-mediated antagonist signal expressed from the ANR (**Fig.3A**). These two opposite signals determine the position of the *Shh*-expressing zli, which in turn defines the limit between anterior and posterior forebrain (Sylvester et al., 2010).

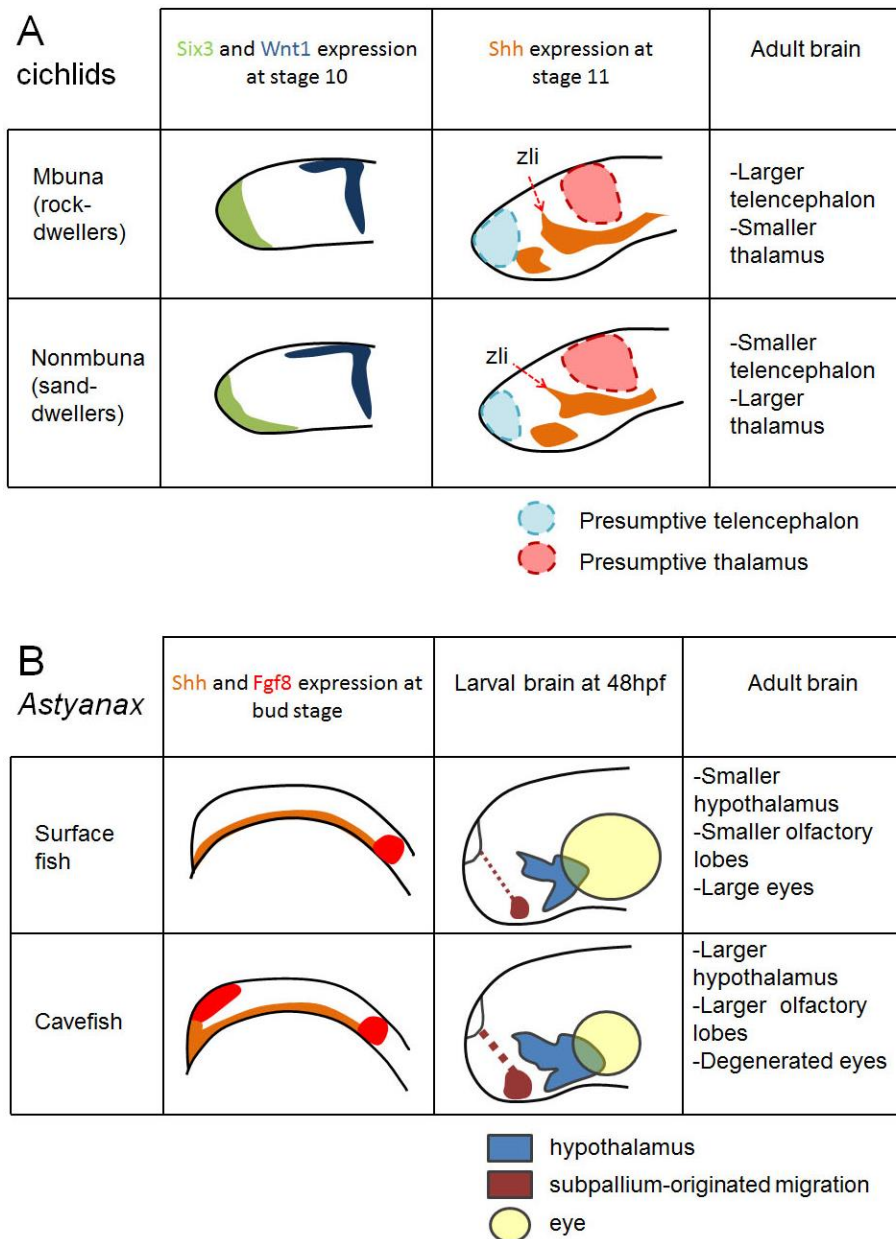


Figure 3: Micro-evolution of signaling centers and patterning of the brain.

A, Evolution of *Six3* (green) and *Wnt1* (dark blue) expressions in cichlids leads to modification of *Shh* expression (orange) and forebrain patterning differences: rock-dwellers possess a larger telencephalon (blue) and a smaller thalamus (red) than sand-dwellers.

B, Expansion of *Shh* expression (orange) and earlier *Fgf8* expression (red) in *Astyanax mexicanus* cavefish result in a larger hypothalamus (blue), larger olfactory lobes, larger stream of olfactory interneurons (purple) and degenerated eyes (yellow).

Another vertebrate micro-evo-devo model provided attractive results about the role of signaling in evolution: *Astyanax mexicanus*, a teleost fish species in which cave populations have evolved specific phenotypes including the loss of eyes and pigmentation. The developmental comparison of these cavefish with surface fish living in nearby rivers allowed demonstrating that the degeneration of the cavefish eye is due to an expansion of *Shh* signaling at the midline of cavefish embryos (Yamamoto et al., 2004) (**Fig.3B**). Moreover in

cavefish embryos, *Fgf8* at the rostral pole of the neural tube is expressed earlier than in their surface fish counterparts (Pottin et al., 2011). These signaling modifications lead to various forebrain patterning modifications: the cavefish hypothalamus is enlarged (as seen from *Nkx2.1* expression), as well as the olfactory bulbs (Menuet et al., 2007; Pottin et al., 2011; Retaux et al., 2008). The migratory stream of interneurons from the subpallium to the olfactory bulbs is also enlarged in cavefish, and all these changes, some of them probably adaptive, depend on *Shh* expansion (Menuet et al., 2007; Pottin et al., 2011).

Unfortunately these two models are the only ones so far in which the role of early signaling and patterning in brain evolution has been studied. Yet other examples of brain microevolution exist. For example, the nine-spine sticklebacks (*Pungitius pungitius*) are fish occupying very diverse habitats, both marine and freshwater. The telencephalon and olfactory bulbs of marine populations are significantly larger than that of pond populations (Gonda et al., 2009). However the underlying mechanisms have not been investigated.

Developmental studies have shown the importance of signaling modifications in the patterning of the brain. Thus in mammals, *Fgf8* seems to specify the antero-posterior positional identity in the cortex primordium. Overexpression of *Fgf8* in the anterior cortical primordium through microelectroporation in mouse embryos leads to an enlarged frontal domain of the cortex at the expense of other domains, notably the primary somatosensory cortex which is reduced and shifted posteriorly. Conversely, electroporation of *sFGFR3*, a soluble receptor sequestering Fgfs, leads to an anterior shift of cortical domains (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001). The evolution of this type of signaling may well underlie the diversification and species-specificity of cortical arealisation. In the squirrel group for example, terrestrial species have relatively larger somatosensory areas than arboreal species, which in turn have more developed visual areas (Krubitzer et al., 2011). Evo-devo studies on this type of models, or on other well-studied rodents (such as diurnal and nocturnal rats), would probably uncover new roles for signaling systems in the evolution of sensory cortex organization.

II- Developmental control of the evolution of brain size and relative brain region size

Evo-devo of proliferation in vertebrates

Although not, or not yet, a research field in itself, the study of cell proliferation in an evo-devo context has recently taken shape due to a renewed interest in the evo-devo of size (Hafen and Stocker, 2003). In vertebrates, it is obvious that differences in body and organ size –the brain for example- amongst species are almost exclusively due to differences in cell number, and therefore in cell proliferation during the developmental period, even if minor differences in cell size do exist (Savage et al., 2007).

When studying comparatively cell proliferation in vertebrate brains, it must be remembered that one deals with an especially difficult problem: indeed, the neuron and glia numbers in vertebrate brains are typically very large compared to the situation in other

metazoans, and therefore difficult to accurately estimate. Moreover, the developmental period during which the brain cells are generated is also typically protracted, and the proliferation process tightly regulated: thus, variations at one time point can often be compensated for later in development. This makes the evaluation of the effects of subtle changes in developmental proliferation rates –the presumed tools of evolution- on *adult* neuron numbers –the actual target of selection- a daunting task.

The comparative, or evo-devo, study of proliferation can be dealt with at several levels.

1 - The most obvious one is that of the ***cell cycle machinery***, i.e., the complexes of cyclin dependent kinases (cdks), cyclins and associated proteins. Although this is considered to be ultra-conserved in metazoan, and indeed in all eukaryotes, recent data from genome sequencing suggest that there is room for innovation even at this level in the vertebrate group. First, the number of cdks, cyclins and, importantly, of cyclin-dependent kinase inhibitors (cdkis) of the Cip/Kip family (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} and p57^{Kip2}, now denominated Cdkn1a, Cdkn1b and Cdkn1c, respectively) and of Rb proteins has increased in vertebrates compared to their closest relatives, presumably following the whole genome duplications (WGD) that happened in this clade. Analysis of the sea urchin genome and comparisons with protostomes suggest that the ancestral situation consists in one Cip/Kip and two Rb-like proteins (Fernandez-Guerra et al., 2006). Mammals typically possess three Cip/Kip and three Rb-like proteins (Vidal and Koff, 2000). Second, and more strikingly, the Ink4 family of cdkis (p14^{Ink4}, p16^{Ink4}, p18^{Ink4}, and p19^{Ink4}, now denominated Cdkn2a, Cdkn2b, Cdkn2c and Cdkn2d, respectively) is probably vertebrate-specific, or at least chordate-specific, since no Ink4 orthologues have ever been found in the sea urchin genome (Fernandez-Guerra et al., 2006) nor in any protostome genome to date.

The expansion of the families of cell cycle core regulators, especially the cdks and cyclins, has resulted in a high degree of redundancy, as well as some degree of tissue specificity, in the control of the cycle in vertebrates. This is evidenced by the phenotypes of various knock-out mice (Malumbres et al., 2004; Santamaria et al., 2007); reviewed in (Malumbres and Barbacid, 2009; Pagano and Jackson, 2004; Sherr and Roberts, 2004). Indeed, the genes coding core cell cycle molecules have all been targeted in the mouse, singly or in combinations, but to our best knowledge no obvious or specific brain phenotype has ever been reported. The only possible exception is mice where cyclins D1 and D2 are lacking (“D3-only” mice) where the defects appear more or less cerebellum-specific (Ciemerych et al., 2002). We are not aware of any study aimed at comparing in details the expression and/or function of these molecules in an “evo-devo” context.

Moreover, if one adopts the evolutionary logical, but not universally accepted, point of view that proliferation is the default state in pluricellular as well as in unicellular organisms (Soto and Sonnenschein, 2004, 2005), then it follows that the ultimate regulation of proliferation has to be a negative one. In the words of B. Edgar: “the basal state of the single-celled eukaryotes that gave rise to metazoa was almost certainly one of proliferation, limited only by nutrients” (Edgar, 2006). The cdkis and Rb-family genes have been targeted singly and in various combinations in the mouse (reviewed in (Vidal and Koff, 2000). In these studies, no brain-specific defect has been detected, although the hypophysis seems to be especially sensitive to the loss of negative regulators of the cycle. Again, we are not aware of any study specifically devoted to the analysis of the expression and/or function of the negative regulators of proliferation with an “evo-devo” approach in mind.

The increase in the number of cell cycle inhibitors in vertebrates, and especially the “invention” of the Ink4 family of cdkis, is nevertheless quite remarkable, and raises interesting questions. It is indeed tempting, albeit extremely difficult to test, to imagine that these duplicates and innovations in negative regulation have allowed for a finer control of the proliferation of neuronal progenitors, and have somehow permitted the very long period of neurogenesis and very large brains found in vertebrates.

2- Another level at which an evo-devo science of cell proliferation can be established is that of **heterochrony**. Broadly speaking, heterochrony can be defined as “an evolutionary change in the timing or rate of developmental events” (Futuyma, 2009), and has long been hypothesized to be an essential force driving morphological changes in evolution (Gould, 1977). The precise definition, meaning and limits of the term “heterochrony” are still debated amongst evolutionists (see for example (McNamara and McKinney, 2005)). However, there is at present no doubt that the time during which the neuroepithelium remains active is a) quite plastic amongst vertebrate species, and b) important in generating brains, and brain structures, of different sizes.

The seminal work on this problem is that of Finlay and Darlington (Finlay and Darlington, 1995). These authors observed that, in mammals, the sizes of the various brain components are highly predictable from total brain size; in other words, the mammalian brain evolution tends to be non-mosaic. Moreover, the order of genesis of the brain subdivisions is also highly conserved in mammals, with the forebrain generated last. It follows that this part of the nervous system is particularly sensitive to changes in the duration of the neurogenic period, the lengthening of which giving rise, for example, to disproportionally large telencephalic structures. This is often referred to as the “late equals large” hypothesis of mammalian brain evolution (**Fig.4**). Although it has never been fundamentally challenged, whether it can account for the whole range of evolutionary size changes observed in vertebrate brains is not clear. First, as Finlay and Darlington point out, their study is limited to mammals. Second, they refer to these linked changes as “easy” brain evolution, and they acknowledge the possibility of a “difficult” evolution, that is, mosaic changes which alter the size of some neural structure(s) only. Finally, there might exist other mechanisms in evolution of brain size than the lengthening/shortening of the neurogenetic period.

These questions have been specifically tackled by Striedter and collaborators, using bird models. On one hand, these studies have provided support for the “late equals large” hypothesis (**Fig.4**): for example, it appears that the considerable telencephalic enlargement that took place in the Psittaciforme lineage (parrots, parakeets, etc...) is indeed a case of heterochrony, i.e., is due to a lengthening of the neurogenic period for this part of the brain (Charvet and Striedter, 2008). On the other hand, other developmental mechanisms underlying size changes have been evidenced by this group. The reduced size of the optic tectum in the parakeet, in comparison to the plesiomorphic situation encountered in the quail, could be due to a very early patterning mechanism: the amount of neural tube tissue devoted to a tectal fate seems smaller in parakeet than in quail (Striedter and Charvet, 2008). In another study, the two-fold difference in brain size between chicken and bobwhite quail was shown to be caused not by a lengthening of the neurogenic period in the chicken, but by an increase in the cell cycle rate of the neural progenitors in this species (Charvet and Striedter, 2010). This phenomenon can be seen as another kind of heterochronic change in neural proliferation. Although these studies have to be confirmed by the use of molecular markers,

they open interesting questions about the possible variety of mechanisms involved in brain size evolution.

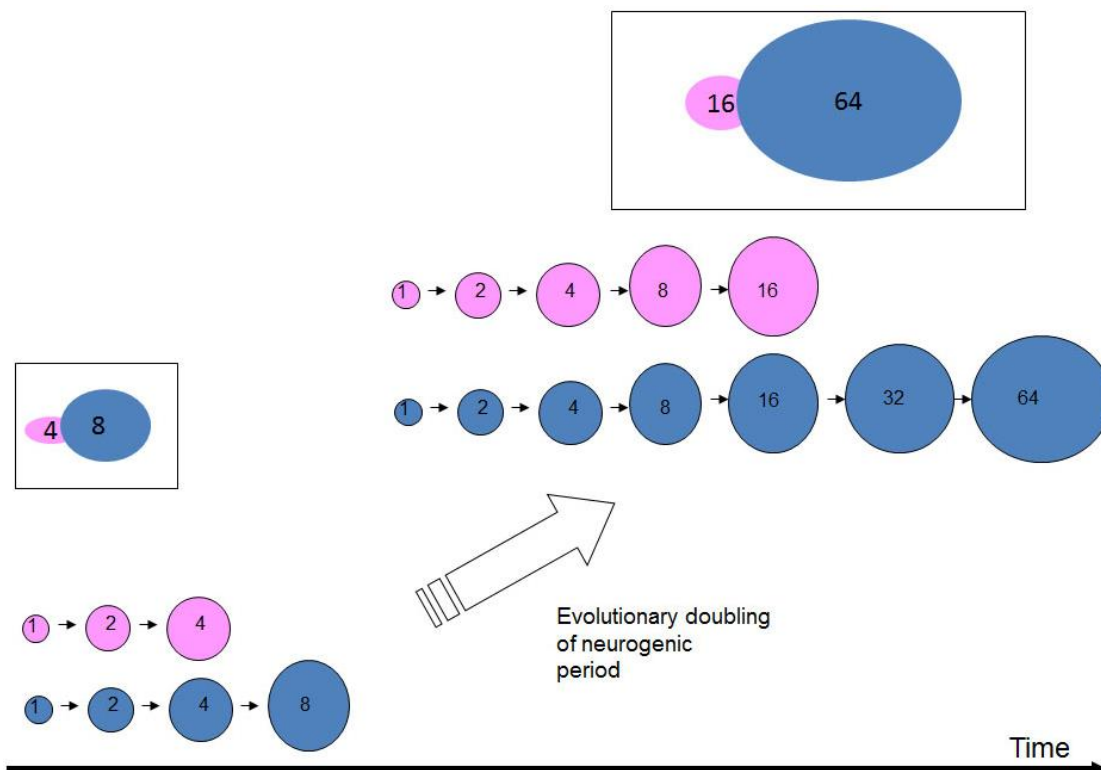


Figure 4: “Late equals large”

Schematized representation of the evolution of a bipartite brain, posterior part in pink, anterior part in blue. The numbers in circles represent the numbers of neuronal progenitors. Doubling the neurogenic period (in evolution) results in a disproportionate enlargement of the anterior part.

In conclusion, heterochronic changes in rate and/or duration of progenitor proliferation seem to be major, but perhaps not exclusive, mechanisms of brain size evolution in amniote vertebrates. It should indeed be stressed that all the studies mentioned here have been performed in birds and mammals. To our knowledge, the teleosts, which encompass about half the vertebrate biodiversity, have not been subjected to this kind of investigations. It would be especially interesting to include these animals in future “evo-devo” analysis of brain size. The teleostean nervous systems indeed exhibit a huge diversity of sizes, and include some of the most extraordinary specializations encountered in vertebrates, for example the gigantocerebellum of mormyrids (Butler and Hodos, 1996). Moreover, they grow differently from amniotes. Typically, the teleostean brains never stop growing along the life of the animals, and it would be important to examine whether some mechanisms evidenced in amniotes also take place in such a context of continuous neurogenesis.

At present, the evo-devo science of proliferation and brain size control is still in its infancy. The sampling of the vertebrate species studied is far from exhaustive, and the data available consist for the most part in volumetric analysis, and in measurements of cell cycle rates and lengths of neurogenic periods. The lack of knowledge on the molecular mechanisms underlying the observed changes is particularly conspicuous. Which mechanisms drive the

cell cycle arrest at precise time and space points in the neuroepithelia that generate the vertebrate brain structures? How is the rate of the cell cycle controlled in various neural progenitors, and in different vertebrates?

Evo-devo of progenitor types

As discussed above, the proliferative capacities of neural progenitors and stem cells are key parameters to the control of the size of the brain region they generate. One beautiful example can be taken from the recent insights gained from studies on mammalian cerebral cortical progenitors.

All mammals possess a pallium or cortex composed of 6 layers, a feature that supposedly enabled higher cognitive function. Among mammals, there are huge variations in the relative size of the cortex (Finlay and Darlington, 1995): humans have a 600 fold increase in cortical weight with respect to rats (to be compared to a 50-fold increase in spinal cord weight). In turn, blue whales or elephants have a five-fold larger cortical sheet than humans. As the thickness of the cortex only varies by a factor ~ 2 , much of this difference is accounted for by a tremendous expansion in the tangential dimension. Such an increase in the surface area of the cortical sheet is often accompanied by the appearance of convolutions, made of gyri (=circles) and sulci (=furrows). Importantly, there are species exhibiting a gyrencephalic cortex (as opposed to a lissencephalic, smooth cortex) in all major families of mammals (see the Comparative Mammalian Brain Collection of the University of Wisconsin)(**Fig.5A**).

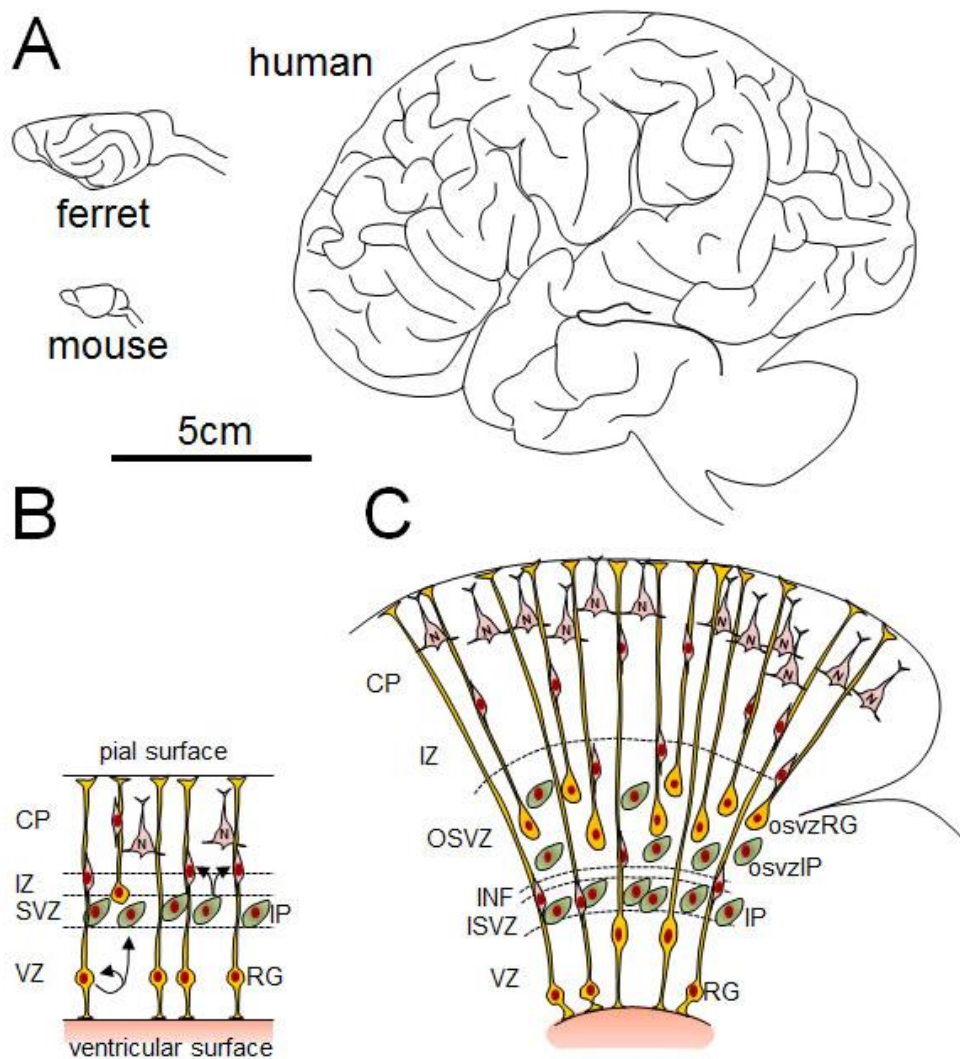


Figure 5: Developmental evolution of the cortex in mammals.

A, Drawings at the same scale of the external anatomy and size of a human, a ferret and a mouse brain taken from pictures in the Comparative Mammalian Brain Collection of the University of Wisconsin. Gyri and sulci are present on the human and ferret cortices, but not in the mouse.

B and C, Progenitor types in the cortical germinal zone of a mouse (**B**) and a primate (**C**).

The pial and ventricular surfaces are indicated.

Layers are indicated on the left: VZ, ventricular zone; SVZ, sub-ventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate; ISVZ/OSVZ, inner and outer sub-ventricular zone; INF, inner fiber layer.

Progenitor types are indicated on the right: RG, radial glia (yellow); IP, intermediate progenitor (green); N, postmitotic neuron (pink).

In the mouse (lissencephalic brain), the cortex is generated from two main types of progenitors: first, the radial glial cells of the ventricular zone (RGs, also called APs for apical progenitors), which express *Pax6*, have processes contacting both the pial and the ventricular surface, undergo asymmetric divisions associated with self-renewal; and second, the intermediate progenitors of the subventricular zone (IPs, also called BPs for basal

progenitors), which express *Tbr2*, usually undergo one symmetric division generating two neurons, therefore serving as transit amplifying progenitors (reviewed in (Merot et al., 2009) (**Fig.5B**).

The initial observation by Smart and colleagues of a unique proliferative compartment in the monkey embryonic cortex, represented by a very large outer subventricular zone (osvz) not previously described in rodents, turned attention on a potential mechanism for primate cortical expansion (Smart et al., 2002). In fact, osvz progenitors are heterogeneous, and include both RG (*Pax6*⁺, self-renewing, stem cell-like) and IP (*Tbr2*⁺, transit amplifying) cell types (**Fig.5C**) (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010). Schematically, the primate germinal zone appears “duplicated”, with coexistence of two types of stem cells, the ventricular and the osvz RGs, each in their respective locations and with slightly distinct proliferative and structural properties. Theoretically, Lui and colleagues (Lui et al., 2011) have calculated that, taking into account the lineage relationships between the different types of progenitors and their modes of division, an osvz-containing cortex should present a four-fold increase in neuron production after 8 cell cycles when compared to an osvz-negative embryonic cortex (Figure 3 in the review of (Lui et al., 2011). Combined to the respective durations of corticogenesis in mouse and monkey (5 days and 11 cell cycles, versus 2 months and 27 cell cycles, respectively), the emergence of a new progenitor type and a new germinal zone in the monkey cortex explains cortical size differences.

One of the structural properties of osvz RGs that differs from ventricular RGs is the absence of a process contacting the ventricular surface: osvz RGs only possess a pial surface contacting process (**Fig.5C**). This feature has profound consequences (experimentally-demonstrated) on the shape of the cortical sheet that is generated: the fanning out of the expanded radial glial scaffold promotes tangential dispersion of neurons migrating towards the cortical plate, and thereby promotes gyration of the cortex (Reillo et al., 2010). Moreover and strikingly in an evo-devo perspective, the existence of osvz-like progenitors is in fact not unique to primates in which they were first described, but rather found in all gyrencephalic mammals examined (Reillo et al., 2010). Even in the lissencephalic mouse and lissencephalic primates, a sparse population of self-renewing progenitors that resemble primate osvz RGs were recently found outside the ventricular zone (Kelava et al., 2011; Shitamukai et al., 2011; Wang et al., 2011). Thus, osvz RG-like progenitor types probably existed in the common ancestor of mammals, and it should be possible to decipher progenitor properties leading to lissencephaly versus gyrencephaly, and those that are unique to primate corticogenesis. Ongoing studies on ferrets (non-primate, gyrencephalic) have begun to uncover subtle differences when compared to primates (Reillo and Borrell, 2011). Among these differences, some are quantitative (RG abundance) and some are qualitative (genetic programs controlling cell cycle kinetics and dynamics of self-renewal), some are time-dependent. Understanding the developmental origin of the heterogeneity and diversity in cortical progenitor types, and analyzing a greater number of mammalian species in this regard, will be key to unravel the mechanisms for the extraordinary expansion of the size of the pallium in mammals.

III- Evolution of *cis*-regulation of brain developmental genes

The data and ideas reviewed in the two first chapters converge on a logical conclusion: much of brain developmental evolution is about the fine tuning of gene expression, and therefore *cis*-regulation. This topic has begun to attract attention of scientists in search of fundamental evolutionary mechanisms, but few studies until now have dealt specifically with

evo-devo of the brain. However *cis*-regulation has to become an important future direction of research for the field. As is the case for patterning events or proliferation control events discussed previously, some aspects of *cis*-regulation are highly conserved, but examples of mechanisms driving changes in brain gene expression between species are now available.

Evolutionary conservation in cis-regulation.

-“*Selector*” *genes*. Among the most surprising results in evolutionary developmental biology is the fact that the diversity of body plans in organisms is not reflected at all in the diversity of the coding sequences of genes, including those of the so-called selector genes, which are key components of the developmental genetic toolkit. Consequently, it was proposed by Sean Carroll and others (Carroll, 2000) that novelty mainly arises through changes in gene regulation. Diverse organisms indeed have highly conserved developmental genes, but in contrast highly divergent regulatory mechanisms for these genes. Changes in the *cis*-regulatory systems of genes would be more numerous and significant than changes in gene numbers or protein functions. Following Carroll, the combinatorial nature of transcriptional regulation would indeed allow for morphological diversification, because variations in the timing and pattern of gene expression allow more subtle and restricted variations than changes in pleiotropic gene products themselves.

Regulatory sequences display strong evolvability, and most transcription factors bind very short (typically 6pb), degenerated and potentially redundant sequences of DNA. For these reasons, it long remained impossible to demonstrate that *cis*-regulatory elements directing the expression of target genes of the so-called “selector” genes exhibit common signatures associated with conserved transcription factors determining the main embryonic fields. Hence, the extraordinary conservation of expression patterns of core selector transcription factors in bilaterians could not be linked to any trace of conservation in the regulatory sequences of the numerous targets of these “master” genes.

This question has been addressed in the central nervous system of chordates by focusing on genes that are active early in the embryo to determine the anterior neuroectoderm. By searching all ascidian conserved non-coding elements for duplicated motifs around genes showing anterior neuroectodermal expression, Haeussler et al. identified an over-represented pentamer motif corresponding to the binding site of the homeodomain protein Otx, which plays a pivotal role in the anterior development of all bilaterian species (see [Fig.1](#), grey line) (Haeussler et al., 2010). Moreover, *cis*-regulatory elements containing duplicated Otx-binding motifs were shown to be active in the anterior neuroectoderm, thus demonstrating that such *cis*-regulatory “signatures” are predictive of neuroectodermal enhancers (Haeussler et al., 2010). Thus, field-specific selector genes (here, *Otx*) impose constraints in the form of combinations of short tags on their target enhancers. These tags are probably conserved at long evolutionary range: a recent study, dealing with the analysis of conserved regulatory sequences bordering genes with expression patterns restricted to the zebrafish forebrain (anterior to the mhb) unraveled the same overrepresentation of duplicated Otx-binding sites in their regulatory elements (Yan Jaszczyszyn and Maximilian Haeussler, personal communication, in preparation).

-“Terminal selector” genes. Are similar logics active at later stages of nervous system development? Subdomains of the brain are progressively defined through the combinatorial actions of transcription factors (see above), and in these domains, populations of neurons expressing specific sets of transcription factors differentiate. Thus, the generation of neuron types in the nervous system is a multistep process resulting in the expression of neuron type-specific genes which govern terminal differentiation and determine the functional properties of a neuron. Whether signatures marking specific differentiation features and corresponding to binding sites of terminal selector genes are also present in regulatory sequences coordinating the expression of differentiation genes long remained enigmatic.

Flames and Hobert studied five genes that code for the dopaminergic machinery in the worm *C. elegans* (Flames and Hobert, 2009). They showed that all 5 genes are co-regulated through a common *cis*-regulatory logic corresponding to the binding of a phylogenetically conserved ETS-domain transcription factor called AST-1. Strikingly, the coordinated expression of all five genes is required in the eight dopaminergic neurons of *C. elegans*, despite their distinct developmental origin. AST-1 was shown to be necessary for the maintenance of the dopaminergic phenotype. In addition, ectopic expression of *AST-1* induced ectopic dopaminergic fate (Flames and Hobert, 2009). In mammals, an *AST-1*-like gene controls some aspects of the dopaminergic fate in olfactory bulb interneurons (but not in all other dopaminergic neurons). This occurs through binding to the same motif as in *C. elegans*. In the same line, Hobert and colleagues have found that all markers of the *C. elegans* cholinergic gene battery and terminal motor neuron fate are co-regulated by a shared *cis*-regulatory signature and a common *trans*-acting factor, the phylogenetically conserved COE-type transcription factor UNC-3 (Kratsios et al., 2011). The chordate ortholog of UNC-3, *Ciona* COE, is also both required and sufficient for inducing a cholinergic fate. Thus, UNC-3 is a terminal selector for cholinergic motor neuron differentiation whose function is conserved across phylogeny (Kratsios et al., 2011), and at least part of the dopaminergic regulatory logic is evolutionary conserved and can be detected in non-coding sequences (Flames and Hobert, 2009).

These studies suggest that differentiation features of a neuron are co-regulated via terminal selector transcription factors that initiate and maintain terminal differentiation programs. Davidson called “kernels” such strongly conserved routines in the genetic networks (Hinman and Davidson, 2007). When these kernels emerged hundreds of MYs ago, they could no longer be modified by evolutionary processes, because any change was deleterious and was eliminated. Evidences for this model are not overwhelming so far, but with the ever increasing amount of genomic sequences accumulated in diverse phyla, we are certainly at the early days of the search for conserved logics at long evolutionary range, and more general assessments on the robustness of gene kernels should in the future emerge from these studies.

-Signaling factors. Signaling molecules also show some degree of conserved *cis*-regulatory logics, albeit differently organized from the above examples. Both *Fgf8* and *Shh* expressions are controlled by numerous, evolutionary conserved enhancers (typically a few hundred base pairs long) that are distributed over very large genomic intervals (Goode et al., 2005; Jeong et al., 2006; Komisarczuk et al., 2009). For example, some *Fgf8* enhancer elements are located in the introns and 5' upstream region of neighboring genes (Komisarczuk et al., 2009) and in mammals, a distal enhancer which drives *Shh* expression in the basal telencephalon is located ~600kb upstream of the first exon (Jeong et al., 2006). For both *Fgf8* and *Shh* loci, the modular nature of *cis*-regulatory elements and the pleiotropy of their gene products probably

allows for selective spatio-temporal changes of expression patterns responsible for morphological changes, although this is not yet functionally demonstrated (see also (Carroll, 2000)).

Typically, *Shh* enhancers have puzzled researchers. Indeed, some *Shh* enhancers are conserved in sequence but not in function: this is the case of the intronic element ar-C, which is active only in the posterior floor plate of mammals, but drives *Shh* expression in the notochord, tegmentum, zli, and hypothalamus of zebrafish (Ertzer et al., 2007; Jeong et al., 2006). Conversely, some *Shh* enhancers are conserved in function but are divergent sequence-wise: this is the case of the lamprey ar-C element which is composed of sub-elements dispersed all along the intron2 sequence, but which nevertheless drives expression in the floor plate and notochord when injected in zebrafish (Kano et al., 2010). Although difficult to demonstrate experimentally, there is probably room for variations and innovations with such a modular structure of enhancers, which can also interact negatively or positively with each other. In order to experimentally test this possibility, it would be necessary to knock-in a specific enhancer sequence of one species into another, assess the detailed spatio-temporal changes in morphogen expression induced by the combinatorial change in regulatory elements, and ultimately analyze their consequences on the functional anatomy of the brain.

Evolutionary modifications in cis-regulation.

Some recent studies have reported a wealth of potential mechanisms by which changes in neurodevelopmental genes regulation can shape brain evolution. Four of them are discussed below, highlighting various means of modifying *cis*-regulation.

-Human accelerated regions. The availability of several mammalian/primate genomes has prompted investigators to search for “human accelerated regions” (=hAR) in the non-coding part of the genome (=98.5% of the genome). Strikingly, these hARs, showing a high nucleotide substitution rate in humans, are significantly enriched in regions adjacent to neurodevelopmental genes (Pollard et al., 2006). One of them, hAR1, 118bp long and shared by all amniotes, was described to present 18 substitutions in the human lineage since the human-chimpanzee split, to be compared to only 2 nucleotides changes between chimpanzee and chicken. The hAR1 sequence is not protein-coding, but is nevertheless transcribed, and the hAR1 transcript can fold into a stable RNA structure of unknown function. The hAR1 expression pattern seems particularly relevant to human cortex evolution: among other sites, hAR1 is expressed in reelin-expressing Cajal-Retzius cells (Pollard et al., 2006), a particular population of cells located in the cortical marginal zone and which plays a major role in the control of neuronal migration and hence lamination of the cerebral cortex (Bar and Goffinet, 2000; Ogawa et al., 1995).

-Transposons acquiring functions. Transposable elements are a known potential source of novelty. Sasaki et al. have studied a family of SINEs (Short Interspersed Elements) that was specifically exapted in the mammalian ancestor and now constitutes a part of the conserved non-coding elements (CNEs) in mammalian genomes (Sasaki et al., 2008). Interestingly, one of these SINEs (600bp long) serves as an enhancer for *Fgf8* expression in the thalamus, where

Fgf8 controls the patterning of thalamic nuclei (relay centers for sensory information from the periphery to the cortex), suggesting a role for Fgf8 in mammalian-specific forebrain patterning. Furthermore, another of these SINEs (also 600bp long) regulates *SATB2* expression in a lateral telencephalic domain which is considered as 1) a signaling center for telencephalic dorso-ventral patterning and 2) a source of Cajal-Retzius cells for the developing cortex (Bielle et al., 2005). Such novelties due to SINEs acquiring enhancer functions relate to items we have discussed above on the potential role of signaling centers in brain evolution, or on the role of Cajal-Retzius cells as excellent candidates for driving pallial evolution.

-Recycling coding regions after genome duplication. S. Ohno, in his theory of “Evolution by gene duplication”, suggested that duplicated genes may be an important source of novelties, through acquisition of novel function(s) by one of the paralogs generated (Ohno, 1970). He did not imagine, though, that one of the duplicates may as well lose its coding function and become a novel regulatory element controlling the expression of an adjacent gene in the syntenic region generated after duplication. Such “Recycled Regions” (RRs) have been searched for in the genome of teleost fish (Eichenlaub and Ettwiller, 2011), taking advantage of their recent WGD (but note that the most common fate for teleost duplicated genes is the loss of a copy, in ~ 75% of cases). The four RRs identified (by an algorithm including a criterion selecting RRs flanked by at least one gene with functional annotation in *development*) all show enhancer activity, and all drive expression of neuro-developmental factors (Eichenlaub and Ettwiller, 2011). These factors, *Pou4f2*, *Zic2/Zic5*, *Axin2*, and *Nkx2.5*, are involved in neuronal specification, proliferation, Wnt signaling, and patterning, respectively, therefore corresponding almost exactly to the developmental evolutionary toolkit that has been discussed in the previous sections. It will therefore be interesting to know whether such recycling of coding sequences to generate novel enhancers which slightly modify expression patterns of neighboring genes can be generalized to other vertebrate lineages.

-Loss of enhancers. Not only gains or additions can be of crucial importance to the emergence of novelty through regulatory changes, so it is also important to emphasize the potential impact of losing enhancers. Along this line, McLean et al., 2011 have studied hCONDELs, i.e., complete deletions in humans of sequences otherwise highly conserved in chimpanzees and other mammals (McLean et al., 2011). Like for hARs, a large subset of hCONDELs are enriched near genes involved in neural development and, more strikingly, near genes acting as suppressors of cell proliferation or migration during corticogenesis. Moreover, the corresponding chimpanzee and mouse sequences were shown to serve as enhancers (McLean et al., 2011). One such hCONDEL (~3kb long) remove a forebrain-specific p300 binding site (therefore confirming its enhancer nature) and is located near the gene *GADD45G*, a tumor suppressor gene. In mouse, this hCONDEL drives *GADD45G* expression in the SVZ of the basal telencephalon and thalamus, where it down-regulates proliferation of progenitors. These regions are the known sources of GABAergic inhibitory interneurons for the cortex and the thalamus, respectively, and the authors hypothesized that increased production of neurons from these regions may have contributed to the thalamic and cortical expansion in humans (McLean et al., 2011). Again, the impact of tightly modifying proliferation and neural progenitor proliferative behavior has been discussed in a previous section as one of the means to generate changes in size and form of a brain structure.

Interestingly, an accelerated recruitment of “new” brain developmental genes coding for fast-evolving proteins has recently been described in the human genome (Zhang et al., 2011). However, changes in non-coding sequences probably represent most of the genome-wide adaptive evolution, and this holds particularly true for brain developmental genes (Haygood et al., 2010). A genome-wide correlation between gene function and evidence for positive selection across human coding and non-coding sequences indicates that neural development and function have adapted mainly through non-coding changes –with the notable exception of olfaction, one of the leading themes of adaptation through coding changes, together with immunity (Haygood et al., 2010). Uncovering the evolutionary forces driving brain diversification is therefore another future direction. The detection of traces of natural selection and neutral evolution in genomes, particularly around key neuronal developmental genes, will probably become one of the tools to understand the story of brain developmental evolution.

Conclusion

In this review we have concentrated on the developmental mechanisms which have the potential to generate evolutionary novelties and/or variations in the functional neuroanatomy of the vertebrate brains. We have identified several points or “nodes” at which, within a common Bauplan to build a vertebrate type of brain, developmental evolution can shape differences. These critical points include the control of early signaling systems, the tight regulation of proliferation, and the emergence of new progenitor types in the embryonic neuroepithelia. These fields of brain evo-devo are still at their beginnings and we anticipate they have a bright future. We have also identified future interesting directions, using comparative genomics, to understand the *cis*-regulation of developmental genes, a key parameter to generate both unity and variations. Hence, within a little more than a century, the study of brain evolution has “evolved” from comparative neuroanatomy, to comparative developmental biology, to comparative genomics. The integration of these different levels, as well as that of comparative behavior –the final outcome of brain function- is to be awaited for the 21st century.

References.

- Bachy, I., Berthon, J., and Retaux, S. (2002). Defining pallial and subpallial divisions in the developing *Xenopus* forebrain. *Mechanisms of development* 117, 163-172.
- Bar, I., and Goffinet, A.M. (2000). Evolution of cortical lamination: the reelin/Dab1 pathway. *Novartis Foundation symposium* 228, 114-125; discussion 125-118.
- Bielle, F., Griveau, A., Narboux-Neme, N., Vigneau, S., Sigrist, M., Arber, S., Wassef, M., and Pierani, A. (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nature neuroscience* 8, 1002-1012.
- Butler, A.B., and Hodos, W. (1996). *Comparative Vertebrate Neuroanatomy. Evolution and Adaptation* (New York, Wiley-Liss).
- Carroll, S.B. (2000). Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell* 101, 577-580.
- Charvet, C.J., and Striedter, G.F. (2008). Developmental species differences in brain cell cycle rates between northern bobwhite quail (*Colinus virginianus*) and parakeets (*Melopsittacus undulatus*): implications for mosaic brain evolution. *Brain, behavior and evolution* 72, 295-306.
- Charvet, C.J., and Striedter, G.F. (2010). Bigger brains cycle faster before neurogenesis begins: a comparison of brain development between chickens and bobwhite quail. *Proceedings* 277, 3469-3475.
- Ciemerych, M.A., Kenney, A.M., Sicinska, E., Kalaszczyńska, I., Bronson, R.T., Rowitch, D.H., Gardner, H., and Sicinski, P. (2002). Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes & development* 16, 3277-3289.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D., and Philippe, H. (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439, 965-968.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.
- Edgar, B.A. (2006). From cell structure to transcription: Hippo forges a new path. *Cell* 124, 267-273.
- Eichenlaub, M.P., and Ettwiller, L. (2011). De novo genesis of enhancers in vertebrates. *PLoS biology* 9, e1001188.
- Ertzer, R., Muller, F., Hadzhiev, Y., Rathnam, S., Fischer, N., Rastegar, S., and Strahle, U. (2007). Cooperation of sonic hedgehog enhancers in midline expression. *Developmental biology* 301, 578-589.
- Fernandez-Guerra, A., Aze, A., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Cormier, P., Bradham, C., Adams, N., Robertson, A.J., Marzluff, W.F., *et al.* (2006). The genomic

repertoire for cell cycle control and DNA metabolism in *S. purpuratus*. *Developmental biology* 300, 238-251.

Fietz, S.A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Brauninger, M., Stenzel, D., Fish, J.L., Corbeil, D., Riehn, A., Distler, W., Nitsch, R., *et al.* (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nature neuroscience* 13, 690-699.

Finlay, B.L., and Darlington, R.B. (1995). Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* (New York, NY) 268, 1578-1584.

Flames, N., and Hobert, O. (2009). Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation. *Nature* 458, 885-889.

Fukuchi-Shimogori, T., and Grove, E.A. (2001). Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science* (New York, NY) 294, 1071-1074.

Futuyma, D.E.S.A. (2009). *Evolution* (Sinauer Associates).

Glaridon, S., Holland, L.Z., Gehring, W.J., and Holland, N.D. (1998). Isolation and developmental expression of the amphioxus Pax-6 gene (AmphiPax-6): insights into eye and photoreceptor evolution. *Development* (Cambridge, England) 125, 2701-2710.

Gonda, A., Herczeg, G., and Merila, J. (2009). Adaptive brain size divergence in nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*)? *Journal of evolutionary biology* 22, 1721-1726.

Goode, D.K., Snell, P., Smith, S.F., Cooke, J.E., and Elgar, G. (2005). Highly conserved regulatory elements around the SHH gene may contribute to the maintenance of conserved synteny across human chromosome 7q36.3. *Genomics* 86, 172-181.

Gould, S.J. (1977). *Ontogeny and Phylogeny* (Cambridge, MA, Belknap Press of Harvard University Press).

Guerin, A., d'Aubenton-Carafa, Y., Marrakchi, E., Da Silva, C., Wincker, P., Mazan, S., and Retaux, S. (2009). Neurodevelopment genes in lampreys reveal trends for forebrain evolution in craniates. *PloS one* 4, e5374.

Guillemot, F. (2005). Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Current opinion in cell biology* 17, 639-647.

Haeussler, M., Jaszczyszyn, Y., Christiaen, L., and Joly, J.S. (2010). A cis-regulatory signature for chordate anterior neuroectodermal genes. *PLoS genetics* 6, e1000912.

Hafen, E., and Stocker, H. (2003). How are the sizes of cells, organs, and bodies controlled? *PLoS biology* 1, E86.

Hansen, D.V., Lui, J.H., Parker, P.R., and Kriegstein, A.R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464, 554-561.

Haygood, R., Babbitt, C.C., Fedrigo, O., and Wray, G.A. (2010). Contrasts between adaptive coding and noncoding changes during human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 7853-7857.

Hinman, V.F., and Davidson, E.H. (2007). Evolutionary plasticity of developmental gene regulatory network architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 19404-19409.

Holland, L.Z., and Short, S. (2008). Gene duplication, co-option and recruitment during the origin of the vertebrate brain from the invertebrate chordate brain. *Brain, behavior and evolution* *72*, 91-105.

Holland, N.D., Panganiban, G., Henyey, E.L., and Holland, L.Z. (1996). Sequence and developmental expression of *AmphiDll*, an amphioxus *Distal-less* gene transcribed in the ectoderm, epidermis and nervous system: insights into evolution of craniate forebrain and neural crest. *Development (Cambridge, England)* *122*, 2911-2920.

Imai, K.S., Satoh, N., and Satou, Y. (2002). Region specific gene expressions in the central nervous system of the ascidian embryo. *Gene Expr Patterns* *2*, 319-321.

Imai, K.S., Stolfi, A., Levine, M., and Satou, Y. (2009). Gene regulatory networks underlying the compartmentalization of the *Ciona* central nervous system. *Development (Cambridge, England)* *136*, 285-293.

Jeong, Y., El-Jaick, K., Roessler, E., Muenke, M., and Epstein, D.J. (2006). A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers. *Development (Cambridge, England)* *133*, 761-772.

Kano, S., Xiao, J.H., Osorio, J., Ekker, M., Hadzhiev, Y., Muller, F., Casane, D., Magdelenat, G., and Retaux, S. (2010). Two lamprey Hedgehog genes share non-coding regulatory sequences and expression patterns with gnathostome Hedgehogs. *PloS one* *5*, e13332.

Kelava, I., Reillo, I., Murayama, A.Y., Kalinka, A.T., Stenzel, D., Tomancak, P., Matsuzaki, F., Lebrand, C., Sasaki, E., Schwamborn, J.C., *et al.* (2011). Abundant Occurrence of Basal Radial Glia in the Subventricular Zone of Embryonic Neocortex of a Lissencephalic Primate, the Common Marmoset *Callithrix jacchus*. *Cereb Cortex*.

Kiecker, C., and Lumsden, A. (2004). Hedgehog signaling from the ZLI regulates diencephalic regional identity. *Nature neuroscience* *7*, 1242-1249.

Komisarczuk, A.Z., Kawakami, K., and Becker, T.S. (2009). Cis-regulation and chromosomal rearrangement of the *fgf8* locus after the teleost/tetrapod split. *Developmental biology* *336*, 301-312.

Kratsios, P., Stolfi, A., Levine, M., and Hobert, O. (2011). Coordinated regulation of cholinergic motor neuron traits through a conserved terminal selector gene. *Nature neuroscience*.

Krubitzer, L., Campi, K.L., and Cooke, D.F. (2011). All rodents are not the same: a modern synthesis of cortical organization. *Brain, behavior and evolution* *78*, 51-93.

- Lee, K.J., and Jessell, T.M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annual review of neuroscience* 22, 261-294.
- Liem, K.F., Jr., Tremml, G., and Jessell, T.M. (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91, 127-138.
- Lin, Y., Cai, Z., Huang, S., Yang, L., Wang, C., Liu, Z., Cao, J., An, Y., and Zhang, H. (2009). Ptc, Smo, Sufu, and the Hedgehog signaling pathway in amphioxus. *Evolution & development* 11, 710-718.
- Lui, J.H., Hansen, D.V., and Kriegstein, A.R. (2011). Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 146, 18-36.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., and Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118, 493-504.
- Mazet, F., Hutt, J.A., Millard, J., and Shimeld, S.M. (2003). Pax gene expression in the developing central nervous system of *Ciona intestinalis*. *Gene Expr Patterns* 3, 743-745.
- McLean, C.Y., Reno, P.L., Pollen, A.A., Bassan, A.I., Capellini, T.D., Guenther, C., Indjeian, V.B., Lim, X., Menke, D.B., Schaar, B.T., *et al.* (2011). Human-specific loss of regulatory DNA and the evolution of human-specific traits. *Nature* 471, 216-219.
- McNamara, K.J., and McKinney, M.L. (2005). Heterochrony, disparity, and macroevolution. *Paleobiology* 31, 17-26.
- Menuet, A., Alunni, A., Joly, J.S., Jeffery, W.R., and Retaux, S. (2007). Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development (Cambridge, England)* 134, 845-855.
- Merot, Y., Retaux, S., and Heng, J.I. (2009). Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 726-734.
- Moret, F., Christiaen, L., Deyts, C., Blin, M., Vernier, P., and Joly, J.S. (2005). Regulatory gene expressions in the ascidian ventral sensory vesicle: evolutionary relationships with the vertebrate hypothalamus. *Developmental biology* 277, 567-579.
- Murakami, Y., Ogasawara, M., Sugahara, F., Hirano, S., Satoh, N., and Kuratani, S. (2001). Identification and expression of the lamprey Pax6 gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates. *Development (Cambridge, England)* 128, 3521-3531.
- Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H., and Takada, S. (2002). Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes & development* 16, 548-553.

Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., and Mikoshiba, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14, 899-912.

Ohno, S. (1970). *Evolution by gene duplication* (New York, Springer).

Onai, T., Lin, H.C., Schubert, M., Koop, D., Osborne, P.W., Alvarez, S., Alvarez, R., Holland, N.D., and Holland, L.Z. (2009). Retinoic acid and Wnt/beta-catenin have complementary roles in anterior/posterior patterning embryos of the basal chordate amphioxus. *Developmental biology* 332, 223-233.

Osorio, J., Mazan, S., and Rétaux, S. (2005). Organisation of the lamprey (*Lampetra fluviatilis*) embryonic brain: Insights from LIM-homeodomain, Pax and hedgehog genes. *Developmental biology* 288, 100-112.

Osorio, J., and Retaux, S. (2008). The lamprey in evolutionary studies. *Development genes and evolution* 218, 221-235.

Pagano, M., and Jackson, P.K. (2004). Wagging the dogma; tissue-specific cell cycle control in the mouse embryo. *Cell* 118, 535-538.

Pani, A.M., Mullarkey, E.E., Aronowicz, J., Assimacopoulos S., Grove, E.A., and Lowe, C.J. (2012) Ancient deuterostome origins of vertebrate brain signaling centers. *Nature* 483, 289-294.

Pollard, K.S., Salama, S.R., Lambert, N., Lambot, M.A., Coppens, S., Pedersen, J.S., Katzman, S., King, B., Onodera, C., Siepel, A., *et al.* (2006). An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature* 443, 167-172.

Pottin, K., Hinaux, H., and Retaux, S. (2011). Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development (Cambridge, England)* 138, 2467-2476.

Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S., and Rubenstein, J.L. (2000). Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *The Journal of comparative neurology* 424, 409-438.

Reillo, I., and Borrell, V. (2011). Germinal Zones in the Developing Cerebral Cortex of Ferret: Ontogeny, Cell Cycle Kinetics, and Diversity of Progenitors. *Cereb Cortex*.

Reillo, I., de Juan Romero, C., Garcia-Cabezas, M.A., and Borrell, V. (2010). A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cereb Cortex* 21, 1674-1694.

Retaux, S., Pottin, K., and Alunni, A. (2008). Shh and forebrain evolution in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 100, 139-147.

Rubenstein, J.L., Shimamura, K., Martinez, S., and Puelles, L. (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annual review of neuroscience* 21, 445-477.

Salzburger, W., and Meyer, A. (2004). The species flocks of East African cichlid fishes: recent advances in molecular phylogenetics and population genetics. *Die Naturwissenschaften* *91*, 277-290.

Santamaria, D., Barriere, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Caceres, J.F., Dubus, P., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* *448*, 811-815.

Sasaki, T., Nishihara, H., Hirakawa, M., Fujimura, K., Tanaka, M., Kokubo, N., Kimura-Yoshida, C., Matsuo, I., Sumiyama, K., Saitou, N., *et al.* (2008). Possible involvement of SINEs in mammalian-specific brain formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 4220-4225.

Savage, V.M., Allen, A.P., Brown, J.H., Gillooly, J.F., Herman, A.B., Woodruff, W.H., and West, G.B. (2007). Scaling of number, size, and metabolic rate of cells with body size in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 4718-4723.

Scholpp, S., Wolf, O., Brand, M., and Lumsden, A. (2006). Hedgehog signalling from the zona limitans intrathalamica orchestrates patterning of the zebrafish diencephalon. *Development (Cambridge, England)* *133*, 855-864.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes & development* *18*, 2699-2711.

Shimamura, K., and Rubenstein, J.L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development (Cambridge, England)* *124*, 2709-2718.

Shimeld, S.M. (1999). The evolution of the hedgehog gene family in chordates: insights from amphioxus hedgehog. *Development genes and evolution* *209*, 40-47.

Shimeld, S.M., van den Heuvel, M., Dawber, R., and Briscoe, J. (2007). An amphioxus Gli gene reveals conservation of midline patterning and the evolution of hedgehog signalling diversity in chordates. *PloS one* *2*, e864.

Shitamukai, A., Konno, D., and Matsuzaki, F. (2011). Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J Neurosci* *31*, 3683-3695.

Smart, I.H., Dehay, C., Giroud, P., Berland, M., and Kennedy, H. (2002). Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* *12*, 37-53.

Soto, A.M., and Sonnenschein, C. (2004). The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? *Bioessays* *26*, 1097-1107.

Soto, A.M., and Sonnenschein, C. (2005). Emergentism as a default: cancer as a problem of tissue organization. *Journal of biosciences* *30*, 103-118.

- Striedter, G.F., and Charvet, C.J. (2008). Developmental origins of species differences in telencephalon and tectum size: morphometric comparisons between a parakeet (*Melopsittacus undulatus*) and a quail (*Colinus virginianus*). *The Journal of comparative neurology* *507*, 1663-1675.
- Sylvester, J.B., Rich, C.A., Loh, Y.H., van Staaden, M.J., Fraser, G.J., and Streelman, J.T. (2010). Brain diversity evolves via differences in patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 9718-9723.
- Takatori, N., Satou, Y., and Satoh, N. (2002). Expression of hedgehog genes in *Ciona intestinalis* embryos. *Mechanisms of development* *116*, 235-238.
- Tomsa, J.M., and Langeland, J.A. (1999). Otx expression during lamprey embryogenesis provides insights into the evolution of the vertebrate head and jaw. *Developmental biology* *207*, 26-37.
- Venkatesh, T.V., Holland, N.D., Holland, L.Z., Su, M.T., and Bodmer, R. (1999). Sequence and developmental expression of amphioxus *AmphiNk2-1*: insights into the evolutionary origin of the vertebrate thyroid gland and forebrain. *Development genes and evolution* *209*, 254-259.
- Vidal, A., and Koff, A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* *247*, 1-15.
- Vieira, C., and Martinez, S. (2006). Sonic hedgehog from the basal plate and the zona limitans intrathalamica exhibits differential activity on diencephalic molecular regionalization and nuclear structure. *Neuroscience* *143*, 129-140.
- Vieira, C., Pombero, A., Garcia-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarria, D., and Martinez, S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *The International journal of developmental biology* *54*, 7-20.
- Wada, H., Saiga, H., Satoh, N., and Holland, P.W. (1998). Tripartite organization of the ancestral chordate brain and the antiquity of placodes: insights from ascidian *Pax-2/5/8*, *Hox* and *Otx* genes. *Development (Cambridge, England)* *125*, 1113-1122.
- Wang, X., Tsai, J.W., LaMonica, B., and Kriegstein, A.R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nature neuroscience* *14*, 555-561.
- Wilson, S.W., and Rubenstein, J.L. (2000). Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* *28*, 641-651.
- Yamamoto, Y., Stock, D.W., and Jeffery, W.R. (2004). Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* *431*, 844-847.
- Zhang, Y.E., Landback, P., Vibranovski, M.D., and Long, M. (2011). Accelerated recruitment of new brain development genes into the human genome. *PLoS biology* *9*, e1001179.

E. Neurochimie chez les *Astyanax*

Article de Elipot et al., publié dans *Nature Communications* en 2014.

Received 19 Dec 2013 | Accepted 13 Mar 2014 | Published xx xxx 2014

A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax* cavefish behavioural syndrome

We use *Astyanax mexicanus*, a single species with surface-dwelling forms (SF) and blind de-pigmented cave forms (CF), to study mechanisms underlying the evolution of brain and behaviour. In CF, the origin of changes in complex motivated behaviours (social, feeding, sleeping, exploratory) is unknown. Here we find a hyper-aminergic phenotype in CF brains, including high levels and neurotransmission indexes for serotonin, dopamine and noradrenaline, and low monoamine oxidase (MAO) activity. Although MAO expression is unchanged in CF, a pro106leu mutation is identified in the MAO coding sequence. This mutation is responsible for low MAO activity and high serotonin neurotransmission index in CF brains. We find the same mutated allele in several natural CF populations, some being independently evolved. Such occurrence of the same allele in several caves may suggest that low MAO activity is advantageous for cave life. These results provide a genetic basis for several aspects of the cavefish 'behavioural syndrome'.

NATURE COMMUNICATIONS | 5:3647 | DOI: 10.1038/ncomms4647 | www.nature.com/naturecommunications

The fish species *Astyanax mexicanus* exists under two forms: river-dwelling morphs and cave-adapted morphs which live in the San Luis Potosi region in Mexico and which are blind and de-pigmented¹. Cavefish are distributed in 29 caves and correspond to at least two distinct lineages, 'old' and 'new'^{2–6} among which individual cave populations have evolved independently at least five times^{7,8}. These two *Astyanax* morphs are advantageously used in comparative and evolutionary studies^{9–11}. Indeed, during the approximately 1 MY since they evolved from their river-dwelling and sighted ancestors⁸, cavefish have evolved a number of morphological, physiological and behavioural traits, most likely in adaptation to the darkness of their subterranean habitat. In particular, *Astyanax* cave morphs have lost their eyes and their pigmentation, and they have also lost sleep^{12,13}, schooling^{14,15} and hierarchical aggressive behaviour^{16–18}. On the other hand, they have gained adaptive behaviours such as attraction to vibrations¹⁹, increased exploratory^{20–24} and food searching behaviour¹⁷, and a special feeding posture^{25,26}. This is sometimes referred to as 'the cavefish behavioural syndrome'. Developmental evolution of specific neural circuits is involved in some of these behavioural changes: an increase in the number of serotonin neurons in the cave forms (CF) hypothalamus was shown responsible for their persistent food searching behaviour¹⁷, and an increase in the number of their head neuromasts is responsible for the emergence of the vibration attraction behaviour²⁷. But the origin of most changes in complex motivated behaviours is unknown.

The broad neuromodulatory control exerted by monoamines in vertebrate brains explains why they have been implicated in a variety of functions and processes (attention and arousal (Noradrenaline, NA), defence and anxiety (dopamine, DA; serotonin, 5-HT), stress and emotions (DA, NA, 5-HT), reward (DA), mood (5-HT), appetite and energy expenditure, sleep/wakefulness (5-HT, NA, Melatonin), motor control (DA, 5-HT), or cognition) and why their deregulation is involved in various pathologies. In fish, monoaminergic systems have recently attracted interest, partly because the zebrafish (*Danio rerio*) appears as a suitable laboratory animal to model some aspects of complex behaviours²⁸ and to study and screen neuroactive molecules^{29,30}. Indeed, monoaminergic systems are globally well conserved and seem to serve the same types of functions in fish and mammals, with some anatomical and genetic exceptions^{31,32}. These include the presence of 5-HT and DA cell bodies in the fish forebrain (5-HT^{17,33–37}; DA^{32,38–42}). Also, there are two tyrosine hydroxylases (THs)⁴³, two tryptophan hydroxylases (TPH)⁴⁴, and two putative COMT genes³² in zebrafish (see Fig. 1a). Conversely, and this is a notable exception, there is only one monoamine oxidase (MAO) gene in all teleosts examined so far (zebrafish, carp, trout and rainbow trout, pike and catfish^{45–50}), whereas two forms of this enzyme, MAO-A and MAO-B, are classically described and studied in mammals^{51–54}.

Here we investigate differences in brain aminergic neurochemistry in surface and cave *Astyanax*. We find high neurotransmission indexes for 5-HT, DA and NA, and low MAO activity in cavefish brains. We then identify a mutation in the MAO coding sequence of cavefish, the same allele being present in several independently evolved natural populations of cavefish. We propose that this mutation could underlie some of the behavioural peculiarities of cavefish, including loss of aggressiveness, absence of schooling and persistent foraging behaviour.

Results

Aminergic neurochemistry of surface and cavefish brains. The levels of 5-HT, NA, DA and their metabolites were measured by

high-performance liquid chromatography (HPLC) in the brains of 3- to 4-month-old surface-dwelling forms (SF) and CF juveniles of the Pachón cave. The synthesis and degradation pathways for the studied monoamines are schematized in Fig. 1a. During dissections, two main parts of the brains were separated through a cut at the level of the midbrain/hindbrain junction (Supplementary Fig. 1a) but for simplification the results are given in Fig. 1 as total brain amounts. Levels of 5-HT, DA and NA were significantly higher in Pachón brains, particularly in the anterior part (Supplementary Fig. 1b). These globally higher levels of the 'primary' monoamines found in Pachón brains are not due to a differential activity of their biosynthetic enzymes, as tyrosine hydroxylase (TH) and tryptophan hydroxylase (TPH) enzymatic activities are identical in brain extracts of the two morphs (TH: SF: 0.357 ± 0.04 and CF: 0.395 ± 0.06 , $P=0.188$. TPH: SF: 0.419 ± 0.02 and CF: 0.387 ± 0.01 , $P=0.528$; both activities expressed in nmoles per mg protein per hour, $n=8$ each. Mann–Whitney test. Throughout text, values are given as mean \pm s.e.m.).

We next compared the levels of monoamine metabolites (Fig. 1c). The intermediate DA metabolite DOPAC showed similar levels in SF and CF, whereas the final DA metabolite HVA was found at lower levels in CF brains. The levels of the 5-HT metabolite 5HIAA were twice lower in CF brains (Fig. 1c). This suggests that the MAO enzyme has differential activities in SF and Pachón.

The 'intensity' index of a neurotransmitter system can be assessed through its metabolite/neurotransmitter ratio: the higher this ratio, the stronger the catabolic activity, the weaker the neurotransmission index. We therefore expressed HPLC results as metabolite/neurotransmitter ratios (Fig. 1d). All three ratios 5HIAA/5-HT, DOPAC/DA and DOPAC+HVA/DA were significantly lower in Pachón brains than in SF, suggesting stronger 5-HT and DA neurotransmissions in Pachón. This was particularly true for the anterior part of the brain (Supplementary Fig. 1). These indexes being dependent on the activity of the MAO enzyme further suggest a differential activity of this degrading enzyme in the two morphs.

We thus compared MAO enzymatic activity in the brains of the two *Astyanax* morphs. Importantly and contrary to mammals, all teleosts tested so far have only one MAO (also true for *Astyanax*, see next paragraphs). Thus, we tested MAO activity *in vitro* on 3-month-old SF and Pachón total brain extracts on three different substrates that are widely used in the literature to assay mammalian MAO-A and/or MAO-B activities: 5-HT, β -phenylethylamine and tyramine. In all three assays, MAO activity was detected, therefore showing both MAO-A- and MAO-B-like properties. Moreover, with all three substrates, MAO activity was about twice lower in Pachón brains (Fig. 2a). In parallel, MAO activity was assessed *in situ* in larval brains using tyramine as substrate, and showed lighter staining in Pachón brains (Fig. 2b,c).

Most of what is currently known on monoamine metabolism in fish comes from the zebrafish model. In this species, MAO is inhibited by both clorgyline and deprenyl⁴⁵ (selective mammalian MAO-A and MAO-B inhibitors, respectively) and displays strong affinity for 5-HT but a modest one for DA, so that MAO inhibition by deprenyl strongly increases 5-HT but not DA and NA levels³⁷. We therefore better characterized MAO properties in our model, using deprenyl. *Astyanax* MAO activity in brain extracts was strongly affected after a treatment with deprenyl (10 μ M) in both SF and CF (Fig. 2d). Moreover, and as expected, after MAO inhibition, 5-HT levels were strongly increased, whereas 5HIAA levels were strongly decreased in both SF and CF brains (Fig. 2e). DOPAC and HVA were also diminished after deprenyl, but DA levels were unaffected (Fig. 2e), suggesting that DA is a poor MAO substrate. Finally, NA levels were also

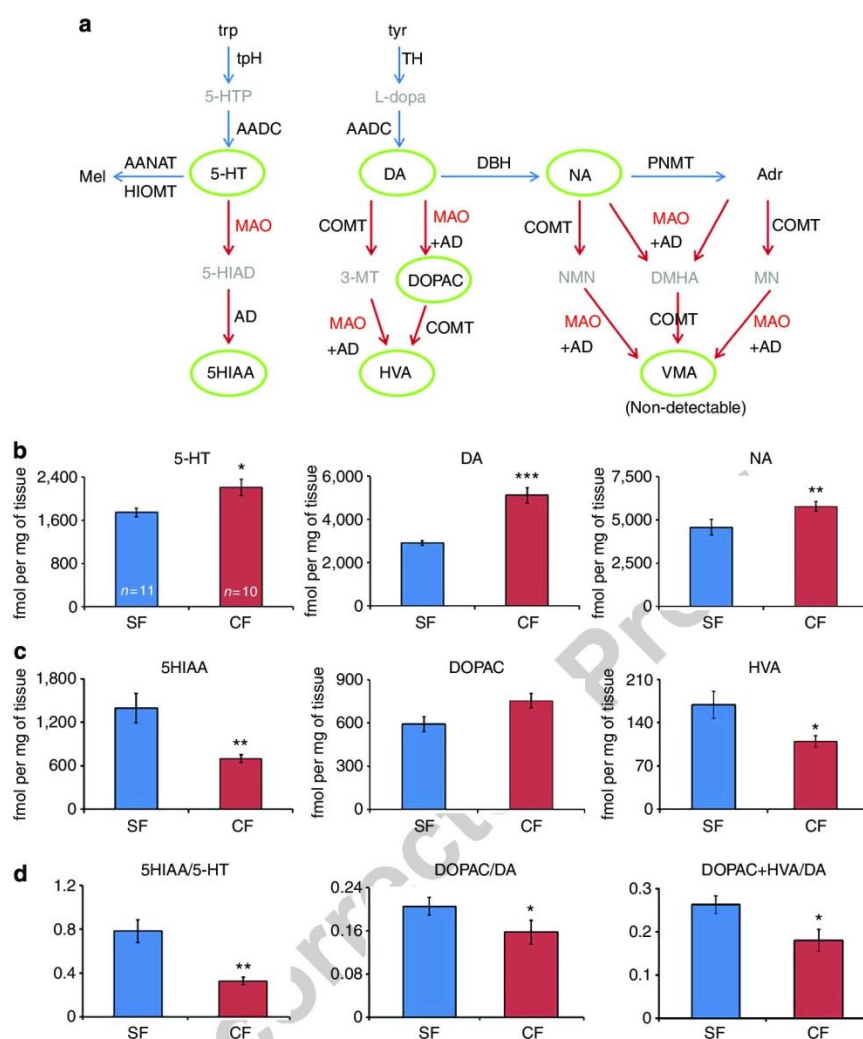


Figure 1 | HPLC measurements of monoamines and metabolites in *Astyanax* SF and Pachón CF. (a) Schema of the principal synthesis and degradation pathways for monoamines. Emphasis is given on the compounds and enzymes studied (MAO in red). A green circle indicates the molecules analysed by HPLC. (b,c) HPLC measurements of indicated monoamines (b) and metabolites (c) in whole brains of SF (blue) and CF (red). VMA was undetectable (<50 fmol per mg tissue). (d) Calculated metabolite/monoamine ratios in SF (blue) and CF (red). Values are indicated as mean \pm s.e.m. Mann-Whitney statistical tests were used and performed with the Statview software. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

unaffected by deprenyl (Fig. 2e). Combined to our finding of undetectable VMA levels in *Astyanax* brains (Fig. 1a), this suggests that NA is not degraded by MAO in this fish. Importantly, SF and CF MAO enzymatic activity and biochemical profiles were affected identically by deprenyl (Fig. 2d,e).

Taken altogether, these data show that low MAO activity in the CF brains explains well the high 5-HT and low 5HIAA levels, and the CF 'hyper-serotonergic' biochemical profile. We next explored two main and non-exclusive hypotheses, that is, a change in MAO expression and/or a change in MAO sequence in Pachón.

MAO expression in surface fish and Pachón cavefish. We cloned a 635-bp fragment of *Astyanax* SF and Pachón CF MAO complementary DNA (cDNA). After phylogenetic analysis, *Astyanax*

MAO grouped consistently with sequences from other teleosts (Fig. 3a and Supplementary Fig. 2). The deduced *Astyanax* SF amino-acid sequence is 95% identical to zebrafish, and 79–78% identical to mouse MAO-A and MAO-B, respectively. Checking in the preliminary contigs assembly of the *A. mexicanus* Pachón genome (GenBank Assembly accession code GCA_000372685.1) further confirmed that there is only one form of the enzyme, like in other teleosts. The cloned fragment was used as a probe to compare the spatio-temporal MAO expression patterns in larval brains of SF and CF (Fig. 3b,c). The onset of MAO expression in *Astyanax* was before 36-h.p.f. MAO transcripts were detected with similar signal intensities in SF and CF larvae of 36–60-h.p.f., throughout the diencephalon and hypothalamus, and in discrete groups of cells in the hindbrain corresponding to raphe, locus coeruleus and internal reticular formation neurons at later stages. MAO expression was interpreted with respect to the distribution

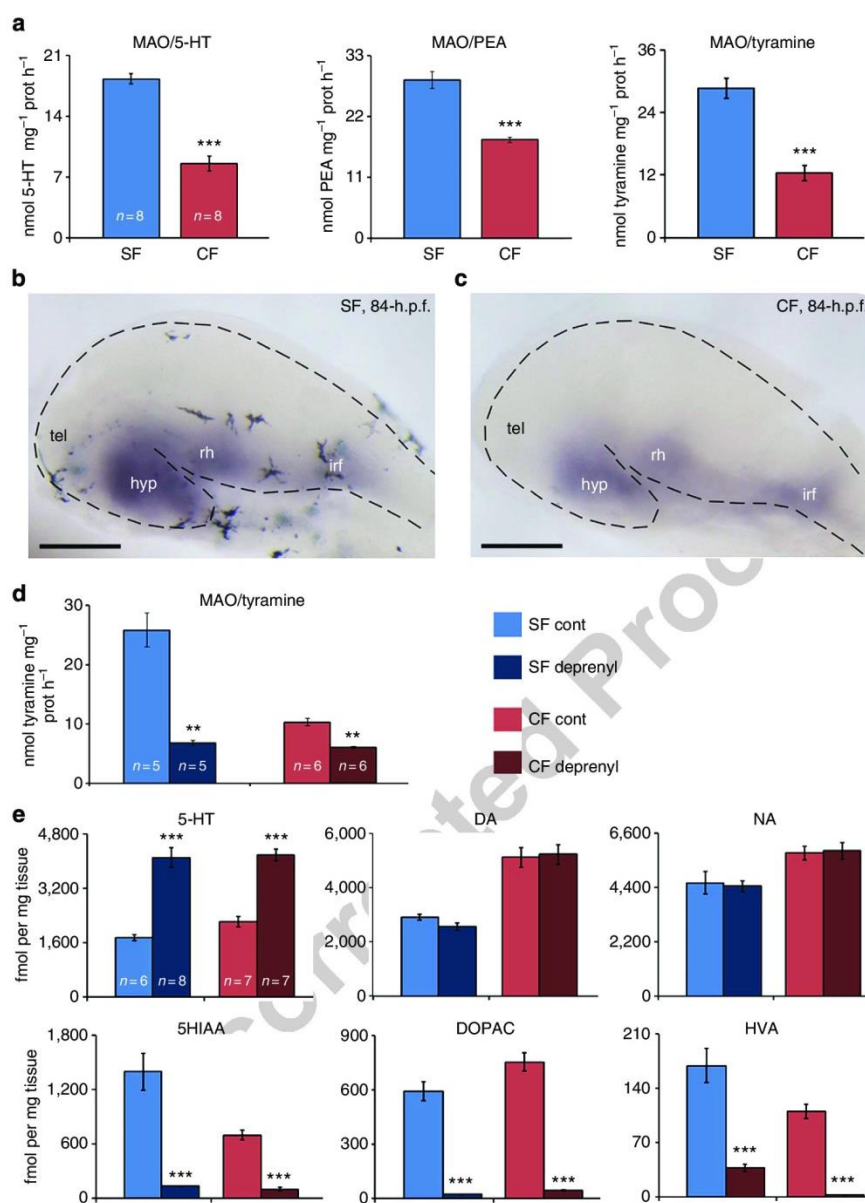


Figure 2 | MAO activity in *Astyanax* SF and Pachón CF. (a) MAO enzymatic activity measurements using indicated substrates in whole brains of SF (blue) and CF (red). PEA, β -phenylethylamine. 5-HT, PEA and tyramine are preferential substrates for mammalian MAO-A, MAO-B or both, respectively. (b,c) *In situ* MAO activity on whole 84-h.p.f. larvae brains pictured on lateral views. Anterior is left and dorsal is up. The intensity of staining is higher in SF brain, suggesting a higher MAO activity *in situ* that parallels the higher activity *in vitro*. Scale bar, 200 μ m. (d) Effect of deprenyl (10 μ M, dark blue and dark red bars) on MAO enzymatic activity in brain extracts from SF and Pachón CF, using tyramine as substrate. (e) Effect of deprenyl (10 μ M, dark blue and dark red bars) on amine and metabolite levels in brain extracts from SF and Pachón CF, measured by HPLC. Values are indicated as mean \pm s.e.m. Mann-Whitney statistical tests were used and performed with the Statview software. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

of TH-expressing cells (corresponding to DA and NA groups) and 5-HT cells (Fig. 3d,e). All the first MAO-expressing cells in the brain correspond to 5-HT cells and to a subset of DA and NA cells, and are located in those regions with high *in situ* MAO activity (compare with Fig. 2b,c). Because *in situ* hybridization is not a quantitative method, we next performed semiquantitative PCR to check for potential differences in MAO mRNA expression levels, using α -actin as a control (Fig. 3f).

MAO cDNA amplification from reverse-transcribed mRNA of 1-week-old larval heads was identical in SF and Pachón. Finally, MAO protein concentrations, assessed by measuring the binding of two selective mammalian MAO-A and MAO-B inhibitors, were identical in SF and Pachón brains (Fig. 3g). Thus the onset, the pattern and the levels of MAO mRNA and protein expression are identical in the brains of the two *Astyanax* morphs.

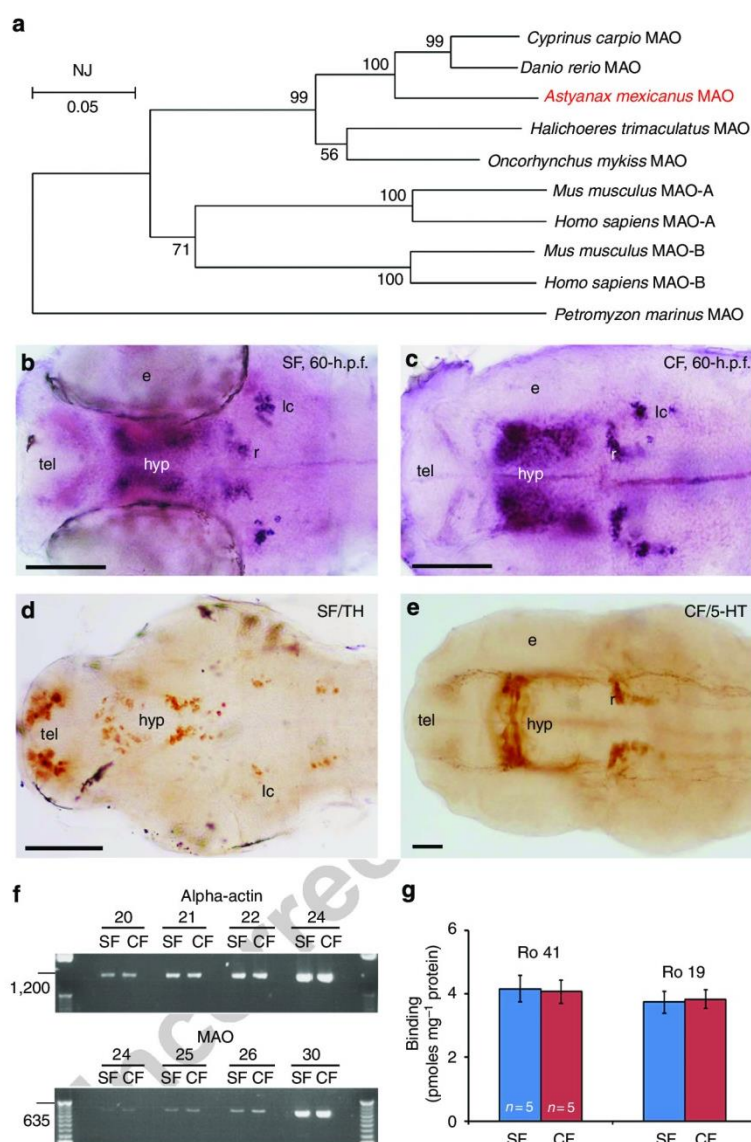


Figure 3 | MAO expression in *Astyanax* SF and Pachón CF. (a) Phylogenetic tree (neighbor joining, NJ) showing the relationships between *Astyanax* and other vertebrate MAO sequences. All teleosts have only one form of the enzyme. A duplication occurred in the amniote lineage. Bootstrap values are indicated. *Cyprinus carpio*: carp. *Danio rerio*: zebrafish. *Halichoeres trimaculatus*: threespot wrasse. *Oncorhynchus mykiss*: trout. *Petromyzon marinus*: marine lamprey (outgroup). (b,c) *In situ* hybridization for MAO mRNA, ventral views of dissected brains of 60-h.p.f. SF and CF larvae. Anterior is left. Scale bar, 100 μ m. (d) Immunohistochemistry for TH, ventral view of a 60-h.p.f. SF dissected brain (eyes were removed). Scale bar, 100 μ m. (e) Immunohistochemistry for 5-HT; ventral view of a 36-h.p.f. CF dissected brain. Scale bar, 100 μ m. (f) Semiquantitative RT-PCR assessment for α -actin (top) and MAO (bottom) mRNA expression levels. After calibration with α -actin, the bands corresponding to MAO amplification appear at the same PCR cycle in SF and CF samples. (g) Binding assays to measure MAO protein concentrations, using the indicated ligands, in whole brains of SF (blue) and CF (red). tel, telencephalon; hyp, hypothalamus; rh, rhombencephalon; irf, internal reticular formation; e, eye; r, raphe nucleus; lc, locus coeruleus. Values are indicated as mean \pm s.e.m. Mann-Whitney statistical tests were used and performed with the Statview software. Significance was set at $P < 0.05$.

A mutation in the Pachón cavefish MAO sequence. One significant coding sequence difference between Pachón CF and SF MAO was detected: a Proline (Pro) to Leucine (Leu) substitution due to a point mutation (CCG > CTG) was observed in 5/5 independent clones of Pachón CF MAO cDNA at position 106, suggesting that the amino-acid change is fixed in our lab-bred Pachón population (Fig. 4a, red arrow and Supplementary

Fig. 3a). This substitution is located in a highly conserved region and at a position where a leucine is found in SF and in all other vertebrate species. Such a substitution is considered as 'radical', the two amino acids having different physico-chemical properties. Moreover, six polymorphic sites are found in Pachón MAO; each in one of the five independent clones of Pachón MAO sequenced (Supplementary Fig. 3a, black arrows). The rest of the

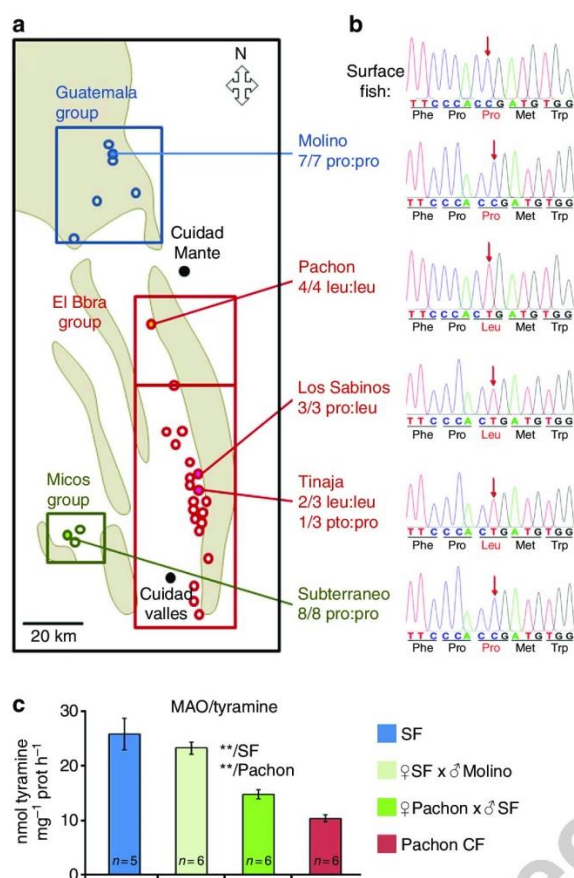


Figure 5 | Distribution of MAO alleles in the wild. (a) Distribution of MAO alleles in Mexican caves on a map redrawn and adapted from refs. 7,10. Each circle indicates a cave hosting cavefish. The cavefish inhabiting the 'El Abra group' originate from an ancient colonization and can further be subdivided into two independent colonization events, while those inhabiting caves from Guatemala and Micos group are supposed to be more recent⁷. Caves from which fin-clips have been analysed are indicated, with their corresponding allele distribution. (b) Sequence chromatograms centred around MAO amino-acid 106, showing that Pachón, Tinaja and Los Sabinos share the exact same allele for leu¹⁰⁶. Also note that SF, Molino and Subterráneo, as well as those individuals with a pro¹⁰⁶ allele in Tinaja and Los Sabinos, share the same proline codon. (c) MAO enzymatic activity, measured using tyramine as substrate, in brain extracts from F1 hybrid individuals obtained after crosses between a Pachón female and a SF male (Pa x SF), or between a SF female and a Molino male (SF x Mo). Values are indicated as mean \pm s.e.m. Mann-Whitney statistical tests were used and performed with the Statview software. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

expanded L-tyrosine pool is available as a precursor for DA in CF⁵⁶. Taken altogether, these data suggest that CF have elevated brain levels of 5-HT and DA (and secondarily NA) caused by two independent mutations in MAO and *Oca2*, respectively.

The Pro106Leu substitution in the cavefish MAO appears like a partial loss of function mutation. The high number of SNPs surrounding this fixed mutation suggests that this region of the protein is prone to mutations (and rapid evolution?) in the cavefish lineage. This corresponds to the 'molecular evolution' component of the change in 5-HT transmission in cavefish. On

the other hand, the increased number of cells in the hypothalamus appears like a gain-of-function phenotype. We have recently shown that the change of size of this particular nucleus in cavefish is due to early developmental signalling and neurogenesis timing differences during embryogenesis of the two morphs¹⁷. Such change corresponds to the 'developmental evolution' component of the variation in monoamine transmission in cavefish. Strikingly, the loss of function/molecular evolution and the gain-of-function/developmental evolution components of the changes observed in cavefish both contribute to an enhancement of 5-HT neurotransmission. This suggests that the CF hyper-serotonergic phenotype could be adaptive for life in cave environment.

We have studied monoamines in *Astyanax* SF and CF brains because these neurotransmitter systems seemed relevant to the known behavioural differences that exist between the two morphs. Some of the well-supported functional correlations are discussed thereafter (Fig. 6). First, the MAO mutation and decreased MAO activity in CF may constitute part of the molecular basis for changes in 'social' behaviours in cavefish, including their loss of aggressiveness^{17,57} and schooling¹⁴ behaviours. Accordingly, deprenyl-treated SF show reduced aggressiveness¹⁷ and reduced schooling¹⁴, whereas deprenyl-treated CF show no change in these behaviours. In fact, in SF, the aggressiveness (measured as attacks between individuals in behavioural tests) corresponds to the establishment of hierarchy between fish, and this behaviour is driven by 5-HT neurons of the raphe nucleus in the hindbrain¹⁷. Moreover, this hierarchical aggressiveness is inversely correlated with the intensity of 5-HT neurotransmission. Evidence for this statement comes from deprenyl treatment that strongly decrease the number of attacks between two SF, and from HPLC measurements of 5-HT content in the raphe nucleus that is much lower in dominant than in subordinate SF individuals¹⁷. We therefore proposed that dominant aggressiveness in SF results from an experience-dependent downregulation of 5-HT content in the raphe. However, the loss of aggressiveness in Pachón CF remained unexplained mechanistically, and was hypothesized to result from an inability of CF to downregulate their raphe 5-HT levels. The present finding of a mutation in the MAO that affects its enzymatic activity, and that condemns CF to have high brain 5-HT levels (including in the raphe) now provides a molecular basis to the hypothesis. Concerning schooling^{14,15}, part of its loss in CF is due to the fact that schooling is dependent on vision (cavefish are blind), but part of it is not. In addition, schooling in SF is abolished after deprenyl treatment¹⁴. It was therefore hypothesized that brain monoamines were involved in the control of schooling in SF. Our present data narrow down and identify the candidate neurotransmitter as serotonin, as due to the fish-specific condition only 5-HT levels (but not DA or NA levels) are affected by deprenyl. Again, the present finding of a MAO mutation that affects its enzymatic activity and that confers CF with high brain 5-HT levels provides a molecular basis to the experimental evidence for the loss of schooling. Of note, Kowalko *et al.*¹⁴ used Tinaja (not Pachón) as *Astyanax* cavefish population in their study. Here we show that the leu¹⁰⁶ allele is also present in the Tinaja population. Finally, we have previously proposed that the loss of aggressiveness in cavefish is related to a general loss of social or collective behaviours during their evolution in subterranean environment⁵⁷. Therefore, the loss of aggressiveness and the loss of schooling could be somehow 'linked', both resulting from the MAO mutation and from the 'hyper-serotonergic' phenotype. However, the exact 5-HT neuronal group that participates in the control of schooling is not known. Second, the MAO-dependent high 5-HT neurotransmission index is also relevant to CF-increased foraging behaviour^{17,57} and

Table 1 | Distribution of MAO alleles in lab-raised and wild animals of the studied caves.

Genotype, MAO position 106	SF lab (n = 4)	SF wild (n = 4)	Pachón lab (n = 5)	Pachón wild (n = 4)	Tinaja wild (n = 3)	Los Sabinos wild (n = 3)	Molino wild (n = 9)	Rio Subterráneo wild (n = 8)
pro:pro	4/4	4/4	0/5	0/4	1/3	0/3	9/9	8/8
leu:leu	0/4	0/4	5/5	4/4	2/3	0/3	0/9	0/8
pro:leu	0/4	0/4	0/5	0/4	0/3	3/3	0/9	0/8

The Leu106 allele is present in caves of the El Abra group. For each individual/fin clip, a minimum of seven independent clones of exon 4 were sequenced to have at least 98.4% chances to detect potential heterozygotes.

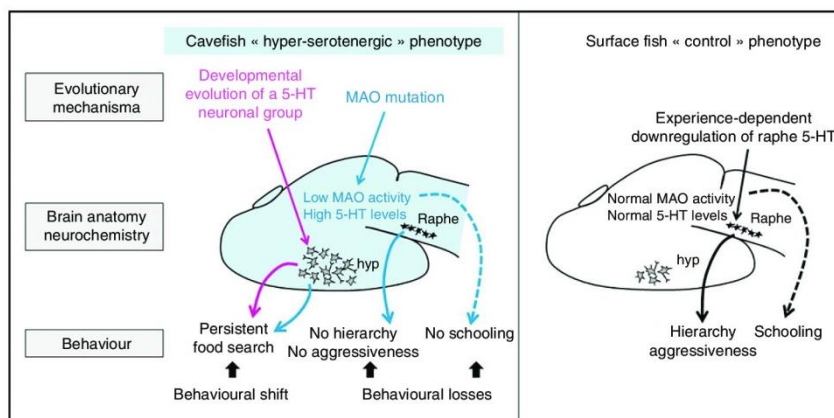


Figure 6 | MAO and serotonergic phenotypes in Pachón cavefish. A schematic drawing puts the present results in the bibliographical context of what was previously established on behavioural evolution in cavefish. Only the serotonergic system is shown. Top, evolutionary mechanisms. Middle, brain anatomy and neurochemistry. Bottom, behavioural outcome. Three types of cavefish behavioural modifications (food search, loss of aggressiveness and loss of schooling) can be attributed to 5-HT neurotransmission, based on their sensitivity to deprenyl. In red, developmental evolution of a neuronal 5-HT group of the anterior hypothalamus contributes to higher 5-HT content in the forebrain of the Pachón CF. This process is dependent on Sonic Hedgehog signalling during early embryogenesis and leads to a cavefish-specific behavioural phenotype consisting in persistent foraging^{17,57}. In green, the MAO mutation leads to low MAO activity and high 5-HT content throughout the CF brain. This impacts raphe-driven aggressive behaviour (plain arrows), as cavefish are unable to downregulate their raphe 5-HT levels like dominant SF do¹⁷. This probably also impacts schooling behaviour, shown to be deprenyl-dependent¹⁴. The dashed line relationship between brain 5-HT content and schooling is solely to indicate that no specific brain region has been identified yet to drive this behaviour.

behavioural drive for food (hypothesis in⁵⁸). Accordingly, deprenyl-treated CF show persistent foraging¹⁷. DA may as well play a role in what could be described as a sort of ‘addiction’ to food in CF.

Third, elevated NA brain levels in CF may be related to their reported loss of sleep¹³. Consistently, a blockade of β 1-adrenergic receptors rescues sleep in CF¹², indeed involving the NA system in this striking behavioural peculiarity. And finally, cavefish swim constantly and longer distances than SF, but this enhanced locomotor activity is unaffected by deprenyl¹⁷, ruling out an involvement of the 5-HT system. In this case, DA or NA neurotransmission could be involved.

We have found the same leu¹⁰⁶ allele in several caves of the El Abra group of caves. As Los Sabinos/Tinaja and Pachón populations are proposed to derive from independent events of the ‘old’ invasion of caves⁷, two hypotheses can be proposed: either the leu¹⁰⁶ allele has been selected (at least twice) in independent caves, probably from standing genetic variation in the surface-dwelling ancestral population; or the leu¹⁰⁶ allele has spread from one of the El Abra caves to the others through cross-hybridizations in the complex underground water system and gene flow between populations. In any case, and again, it suggests that low MAO activity is advantageous for cave life.

In humans, MAO-A/B sequences seem very constrained as only two point mutations in the coding sequence of MAO-A have been described in patients with intellectual disability and impulsive, violent behaviour^{59,60}. The cavefish aminergic condition, including high neurotransmission indexes and a mutation in their MAO enzyme, would probably be considered strongly pathological in humans⁶¹, yet they thrive in their caves since about one million years.

Methods

Fish. Laboratory stocks of *A. mexicanus* surface fish and cavefish (Pachón population) were obtained in 2004–2006 from the Jeffery laboratory at the University of Maryland, College Park, MD, USA and were since then bred in our local facility. Fish were maintained at 23–26 °C on 12:12-h light: dark cycle and they were fed twice a day with dry and living food. The fry were raised in Petri dishes and fed with 2-day-old artemia after opening of the mouth⁶². Animals were treated according to the French and European regulations for handling of animals in research. SR’s authorization for use of animals in research is number 91–116, and Paris Centre-Sud Ethic Committee authorization numbers are 2012-0054 and -0056. Fin-clips from wild-caught animals were collected under the auspices of Mexican permit 02241/13 delivered to SR by Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

HPLC. HPLC assays were performed on fresh tissue. Three- to five-month-old juvenile fish were euthanized by immersion in ice-cold water for 1 min, weighed, measured and sexed. Brains were rapidly dissected out on ice and cut in two parts

at the level of the midbrain/hindbrain junction: the anterior part which, in fish, contains the 5-HT hypothalamic neurons and the DA telencephalic, hypothalamic and posterior tuberculum neuronal groups and the posterior part which contains the 5-HT raphe hindbrain neurons and the locus coeruleus and rhombencephalic NA neurons, which are similar to mammals. Samples were immersed in hydrochloric acid (10^{-3} M), weighed and frozen at -80°C . Before analysis, brains were crushed and centrifuged at 22,000 g for 20 min at 5°C . The supernatants were collected and filtered through a 10-kDa membrane (Nanosep, Pall) by centrifugation at 7,000 g. Then, a 20- μl aliquot of sample was analysed for serotonin (5-HT) by fluorometric detection¹. The amounts of catecholamines (dopamine/DA, noradrenalin/NA) and their metabolites (DOPAC, HVA) as well as the 5-HT metabolite 5HIAA were measured by electrochemical detection on a serial array of coulometric flow-through graphite electrodes (CoulArray, ESA). The analysis, data reduction and peak identification were fully automated. Results were expressed as femtomoles per mg of fresh tissue.

Deprenyl treatments. We used R-deprenyl hydrochloride (Sigma Aldrich) dissolved in tank water. Deprenyl (10 μM) was added during 5 h before the sacrifice of the animals.

MAO activity. *In vitro*: MAO (EC.1.4.3.4.) enzymatic activities were determined on whole-brain homogenates or on cell homogenates (after thawing, tissues or cells were homogenized in 5 volumes of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.40, using all glass homogenizers, Potter–Elvehjem) by a radioenzymatic assay using either [^{14}C]-5-HT creatinine sulphate (1.96 GBq mmol $^{-1}$, Amersham GE Healthcare, Saclay, France, final concentration 20 μM), or [^{14}C]- β -phenylethylamine (2.07 GBq mmol $^{-1}$, Amersham GE Healthcare, Saclay, France, final concentration 20 μM), or [^{14}C]-tyramine hydrochloride (1.85 Bq mmol $^{-1}$, final concentration 20 μM) as substrates. In brief, 20- μl aliquots of the homogenates were pre-incubated (possibly with an inhibitor) in a total volume of 220 μl at 37°C for 30 min. At the end of the pre-incubation period, the enzyme reaction was started by addition of 80 μl of one MAO substrate and the incubation continued for 10 min at 37°C . Then, the reaction was stopped by addition of 200 μl of 2 N HCl, and the deaminated metabolites were extracted by vigorous shaking for 10 min with 5 ml of diethylether (5-HT extraction) or *n*-heptane (PEA extraction) or anisole (tyramine extraction). After centrifugation (1,000 g; 30 s) the water phase was frozen in dry ice and the organic layer poured into plastic vials containing 5 ml of scintillation cocktail. Finally, the radioactivity was determined in a scintillation spectrometer. Reaction mixtures as described above, but lacking the homogenate, served as blanks. In our experimental conditions, the enzymatic reaction was linear with time and homogenate concentration.

In situ: MAO enzymatic activities were determined *in situ* on whole larvae. After euthanasia on ice, larvae were frozen on nitrogen and placed in a water bath at 37°C for 30 min. They were pre-incubated for 30 min in a solution consisting of 1% dimethylsulphoxide (Sigma), 10% of Triton X100 and 10% Tween20 dissolved in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6). The labelling occurred after several hours in the reaction solution consisting of diaminobenzidine tetrachloride (Sigma Aldrich tablets), horseradish peroxidase (ABC kit, Universal Vectastain Kit PK6200), 6 mg ml $^{-1}$ of nickel ammonium sulphate (Nakarai Chemic LS) and 1 mg ml $^{-1}$ of tyramine hydrochloride (Sigma), dissolved in 1 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6).

MAO protein. MAO protein concentration was assessed by measuring the binding of [^3H]-Ro 19-6327 [N-(2-aminoethyl)-5-chloropicolinamide HCl, lazabemide] (0.96 TBq mmol $^{-1}$, Amersham GE Healthcare, Saclay, France) and [^3H]-Ro 41-1049 (0.31 TBq mmol $^{-1}$, Amersham GE Healthcare), two selective inhibitors of mammalian MAO-B and MAO-A respectively, to SF and Pachón brains. Both ligands gave significant bindings on *Aspianax* brain samples. A buffer solution (pH = 7.40) containing 50 mM Tris, 120 mM NaCl, 1 mM MgCl $_2$, 5 mM KCl and 0.5 mM EGTA was used in all experiments. Both radioligands were used at 15 nM final concentration. Incubations were performed for 60 min at 37°C ([^3H]-Ro 41-1049) and for 90 min at 22°C ([^3H]-Ro 19-6327) followed by a 30 s + 30 s + 1 min wash in cold buffer and a quick dip in cold distilled water. Non-specific binding was determined by incubation in the presence of 1 μM of clorgyline ([^3H]-Ro 41-1049) or L-deprenyl ([^3H]-Ro 19-6327). Binding quantification was determined by liquid scintillation counting after filtration onto Whatman GF/B glass microfiber disks, which were then soaked in a 2-ml scintillation cocktail overnight with agitation before counting 24 h later (the recovery of this method was consistent since the values of five replicate measurements varied by <5%).

MAO cDNA cloning and exon amplification from genomic DNA. Total RNA from Pachón CF and SF larvae was reverse transcribed with random primers using AMV reverse transcriptase (Promega). A partial cDNA sequence for MAO (635 bp) was amplified by PCR using the following primers designed on 454 transcriptomic sequence data. MAOF: 5'-GGTCTGAGTGCAGCCAAGCTG-3'. MAOR: 5'-GTG GACCTGGGCGGAGCTTA-3'. PCR products were sub-cloned in TOPO-PCR II vector (Invitrogen) and sequenced. *Aspianax* MAO sequences were aligned with family members in other species, and phylogenetic trees were constructed with the Neighbour Joining method using MEGA5.

Genomic DNA was extracted from fin-clips conserved in ethanol. PCR was then performed on ~20 ng of genomic DNA with the following primers designed to amplify MAO exon4 (150 bp). MAOex4F: 5'-GGGAAATCATATCCATTCGAAG GGG-3'. MAOex4R: 5'-CTCCATGCCCATCTTGCCATAG-3'. PCR products were sub-cloned in TOPO-PCR II vector (Invitrogen) and sequenced. For each individual/fin-clip, a minimum of seven independent clones of exon4 were sequenced to have at least 98.4% chances to detect potential heterozygotes.

Semiquantitative PCR. In total, 10–20 heads from 1-week-old larvae were immersed in Trizol. Total RNA was extracted as described in the manufacturer's instructions and reverse transcribed as above. PCR with α -actin primers (actinF: 5'-GGATTTCGCTGGAGATGATGCTC-3'; actinR: 5'-CGTCACCTTCACCGTTC CAGT-3') was used to calibrate for identical amounts of cDNA used as templates for SF and CF. Aliquots from the PCR reaction were removed at successive PCR cycles and loaded on a gel.

Immunohistochemistry and *in situ* hybridization. Samples were fixed in (paraformaldehyde 4% in phosphate-buffered saline), gradually dehydrated in methanol and stored at -20°C .

For immunohistochemistry, permeabilization was achieved in phosphate-buffered saline with 1% dimethylsulphoxide and 0.5% Triton, followed by incubation in a rat anti-serotonin primary antibody (Chemicon MAB 352, 1/200) or mouse anti-tyrosine hydroxylase antibody (Vector AbCys, VMA318), followed by secondary biotinylated goat anti-rat antibody (Jackson 112-066-072, 1/500) and biotinylated horse anti-mouse antibody (Vector, BA-2080), respectively. Revelation was performed using an avidin/biotin complex coupled with peroxidase (ABC kit, Universal Vectastain Kit PK6200) and diaminobenzidine (Sigma Aldrich).

For *in situ* hybridization, MAO cDNA (635 bp, see above) was amplified by PCR, and digoxigenin-labelled riboprobes were synthesized from PCR templates. A protocol for automated whole-mount *in situ* hybridization (Intavis) was performed. Briefly, embryos were progressively re-hydrated, permeabilized by proteinase K (Sigma) treatment before being incubated overnight at 68°C in hybridization buffer containing the MAO probe. After stringent washes, the hybridized probes were detected by immunohistochemistry using an alkaline phosphatase-conjugated antibody against digoxigenin (Roche) and a NBT/BCIP chromogenic substrate (Roche).

After staining, embryos and/or brains were dissected out, mounted in glycerol and photographs were taken on a Nikon E800 microscope equipped with a DXM1200 camera.

MAO mutagenesis and cell culture assay. The pro>leu mouse MAO-A and MAO-B mutant forms were generated from WT-MAOs using site-directed mutagenesis (Quikchange II kit; Stratagene) and sub-cloned in pCDNA3.1 (Invitrogen). COS-7 cells (5×10^4 cells per well, 24-well format) were plated in 0.5 ml of complete growth medium. For transfection, cell density was 70–80% confluent. For each well of cells to be transfected, 0.5 μg of DNA was diluted into 100 μl of Opti-MEM medium without serum. Then, 0.5 μl PLUS Reagent (a 1:1 ratio to DNA) was added directly to the diluted DNA and incubated for 15 min at room temperature after a gentle mix. For each well of cells, 2 μl of Lipofectamine LTX was added to the above diluted DNA solution, mixed gently and incubated for 25 min at room temperature. A total of 100 μl of this mixture was added directly to each well and mixed by rocking the plate back and forth. Cells were incubated at 37°C in a CO $_2$ incubator for 48 h post transfection before assaying for MAO activity as described above and using tyramine as a substrate.

References

- Mitchell, R. W., Russell, W. H. & Elliott, W. R. Mexican eyeless characin fishes, genus *Aspianax*: environment, distribution, and evolution. *Spec. Publ. Mus. Texas Tech. Univ.* **12**, 1–89 (1977).
- Dowling, T. E., Martasian, D. P. & Jeffery, W. R. Evidence for multiple genetic forms with similar eyeless phenotypes in the blind cavefish, *Aspianax mexicanus*. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 446–455 (2002).
- Hausdorf, B., Wilkens, H. & Strecker, U. Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Aspianax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Mol. Phylogenet. Evol.* **60**, 89–97 (2011).
- Strecker, U., Bernatchez, L. & Wilkens, H. Genetic divergence between cave and surface populations of *Aspianax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Mol. Ecol.* **12**, 699–710 (2003).
- Strecker, U., Faundez, V. H. & Wilkens, H. Phylogeography of surface and cave *Aspianax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* **33**, 469–481 (2004).
- Strecker, U., Hausdorf, B. & Wilkens, H. Parallel speciation in *Aspianax* cave fish (Teleostei) in Northern Mexico. *Mol. Phylogenet. Evol.* **62**, 62–70 (2012).
- Bradic, M., Beerli, P., Garcia-de Leon, F. J., Esquivel-Bobadilla, S. & Borowsky, R. L. Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Aspianax mexicanus*). *BMC Evol. Biol.* **12**, 9 (2012).

8. Gross, J. B. The complex origin of *Astyanax* cavefish. *BMC Evol. Biol.* **12**, 105 (2012).
9. Jeffery, W. R. Emerging model systems in evo-devo: cavefish and microevolution of development. *Evol. Dev.* **10**, 265–272 (2008).
10. Jeffery, W. R. Regressive evolution in *Astyanax* cavefish. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 25–47 (2009).
11. Rétaux, S. & Casane, D. Evolution of eye development in the darkness of caves: adaptation, drift, or both? *EvoDevo* **4**, 26 (2013).
12. Duboue, E. R., Borowsky, R. L. & Keene, A. C. beta-Adrenergic signaling regulates evolutionarily derived sleep loss in the Mexican cavefish. *Brain Behav. Evol.* **80**, 233–243 (2012).
13. Duboue, E. R., Keene, A. C. & Borowsky, R. L. Evolutionary convergence on sleep loss in cavefish populations. *Curr. Biol.* **21**, 671–676 (2011).
14. Kowalko, J. E. *et al.* Loss of schooling behavior in cavefish through sight-dependent and sight-independent mechanisms. *Curr. Biol.* **23**, 1874–1883 (2013).
15. Wilkens, H. Evolution and genetics of epigean and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the neutral mutation theory. In: *Evolutionary Biology*. Vol. 23, (eds Hecht, M. K. & Wallace, B.) 271–367 (Plenum, New York and London, 1988).
16. Burchards, H., Dölle, A. & Parzefall, J. Aggressive behavior of an epigean population of *Astyanax mexicanus* and some observations on three subterranean populations. *Behav. Processes* **11**, 225–235 (1985).
17. Elipot, Y., Hinaux, H., Callebort, J. & Rétaux, S. Evolutionary shift from fighting to foraging in blind cavefish through changes in the serotonin network. *Curr. Biol.* **23**, 1–10 (2013).
18. Espinasa, L., Yamamoto, Y. & Jeffery, W. R. Non-optical releasers for aggressive behavior in blind and blinded *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Behav. Processes* **70**, 144–148 (2005).
19. Yoshizawa, M., Goricki, S., Soares, D. & Jeffery, W. R. Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Curr. Biol.* **20**, 1631–1636 (2010).
20. Pottin, K., Hyacinthe, C. & Rétaux, S. Conservation, development, and function of a cement gland-like structure in the fish *Astyanax mexicanus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 17256–17261 (2010).
21. Windsor, S., Paris, J. & de Perera, T. B. No role for direct touch using the pectoral fins, as an information gathering strategy in a blind fish. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* **197**, 321–327 (2011).
22. Windsor, S. P., Norris, S. E., Cameron, S. M., Mallinson, G. D. & Montgomery, J. C. The flow fields involved in hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). Part II: gliding parallel to a wall. *J. Exp. Biol.* **213**, 3832–3842 (2010).
23. Windsor, S. P., Norris, S. E., Cameron, S. M., Mallinson, G. D. & Montgomery, J. C. The flow fields involved in hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). Part I: Open water and heading towards a wall. *J. Exp. Biol.* **213**, 3819–3831 (2010).
24. Windsor, S. P., Tan, D. & Montgomery, J. C. Swimming kinematics and hydrodynamic imaging in the blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). *J. Exp. Biol.* **211**, 2950–2959 (2008).
25. Kowalko, J. E. *et al.* Convergence in feeding posture occurs through different genetic loci in independently evolved cave populations of *Astyanax mexicanus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 16933–16938 (2013).
26. Schemmel, C. Studies on the genetics of feeding behaviour in the cave fish *Astyanax mexicanus* f. *Anoptichthys*. An example of apparent monofactorial inheritance by polygenes. *Z. Tierpsychol.* **53**, 9–22 (1980).
27. Yoshizawa, M. & Jeffery, W. R. Evolutionary tuning of an adaptive behavior requires enhancement of the neuromast sensory system. *Commun. Integr. Biol.* **4**, 89–91 (2011).
28. Norton, W. & Bally-Cuif, L. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neurosci.* **11**, 90 (2010).
29. Kokel, D. *et al.* Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 231–237 (2010).
30. Kokel, D. & Peterson, R. T. Using the zebrafish photomotor response for psychotropic drug screening. *Methods Cell. Biol.* **105**, 517–524 (2011).
31. Maximino, C. & Herculano, A. M. A review of monoaminergic neuropsychopharmacology in zebrafish. *Zebrafish* **7**, 359–378 (2010).
32. Panula, P. *et al.* The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol. Dis.* **40**, 46–57 (2010).
33. Ekstrom, P., Nyberg, L. & van Veen, T. Ontogenetic development of serotonergic neurons in the brain of a teleost, the three-spined stickleback. An immunohistochemical analysis. *Brain Res.* **349**, 209–224 (1985).
34. Ekstrom, P. & Van Veen, T. Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the brain of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. *J. Comp. Neurol.* **226**, 307–320 (1984).
35. Lillesaar, C. The serotonergic system in fish. *J. Chem. Neuroanat.* **41**, 294–308 (2011).
36. Lillesaar, C., Stigloher, C., Tannhauser, B., Wullmann, M. F. & Bally-Cuif, L. Axonal projections originating from raphe serotonergic neurons in the developing and adult zebrafish, *Danio rerio*, using transgenics to visualize raphe-specific *pet1* expression. *J. Comp. Neurol.* **512**, 158–182 (2009).
37. Sallinen, V. *et al.* Hyperserotonergic phenotype after monoamine oxidase inhibition in larval zebrafish. *J. Neurochem.* **109**, 403–415 (2009).
38. Filippi, A., Mahler, J., Schweitzer, J. & Driever, W. Expression of the paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes *th1* and *th2* reveals the full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish larval and juvenile brain. *J. Comp. Neurol.* **518**, 423–438 (2010).
39. Ma, P. M. Catecholaminergic systems in the zebrafish. IV. Organization and projection pattern of dopaminergic neurons in the diencephalon. *J. Comp. Neurol.* **460**, 13–37 (2003).
40. Ryu, S., Holzschuh, J., Mahler, J. & Driever, W. Genetic analysis of dopaminergic system development in zebrafish. *J. Neural. Transm. Suppl.* **61–66** (2006).
41. Yamamoto, K., Ruuskanen, J. O., Wullmann, M. F. & Vernier, P. Differential expression of dopaminergic cell markers in the adult zebrafish forebrain. *J. Comp. Neurol.* **519**, 576–598 (2011).
42. Yamamoto, K., Ruuskanen, J. O., Wullmann, M. F. & Vernier, P. Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates. New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **43**, 394–402 (2010).
43. Candy, J. & Collet, C. Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts. *Biochim. Biophys. Acta* **1727**, 35–44 (2005).
44. Bellipanni, G., Rink, E. & Bally-Cuif, L. Cloning of two tryptophan hydroxylase genes expressed in the diencephalon of the developing zebrafish brain. *Gene Expr. Patterns* **2**, 251–256 (2002).
45. Anichtchik, O., Sallinen, V., Peitsaro, N. & Panula, P. Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* **498**, 593–610 (2006).
46. Chen, K., Wu, H. F., Grimsby, J. & Shih, J. C. Cloning of a novel monoamine oxidase cDNA from trout liver. *Mol. Pharmacol.* **46**, 1226–1233 (1994).
47. Kumazawa, T., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O. & Sato, K. Monoamine oxidase activities in catfish (*Parasilurus asotus*) tissues. *J. Enzyme Inhib.* **13**, 377–384 (1998).
48. Nicotra, A. & Senatori, O. Some characteristics of mitochondrial monoamine oxidase activity in eggs of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. C* **92**, 401–404 (1989).
49. Senatori, O., Nicotra, A. & Scopelliti, R. Monoamine oxidase activity in embryos of pike (*Esox lucius*). *Comp. Biochem. Physiol. C* **96**, 87–90 (1990).
50. Setini, A., Pierucci, F., Senatori, O. & Nicotra, A. Molecular characterization of monoamine oxidase in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **140**, 153–161 (2005).
51. Bach, A. W. *et al.* cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 4934–4938 (1988).
52. Grimsby, J., Chen, K., Wang, L. J., Lan, N. C. & Shih, J. C. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 3637–3641 (1991).
53. Grimsby, J., Lan, N. C., Neve, R., Chen, K. & Shih, J. C. Tissue distribution of human monoamine oxidase A and B mRNA. *J. Neurochem.* **55**, 1166–1169 (1990).
54. Zhu, Q. S., Grimsby, J., Chen, K. & Shih, J. C. Promoter organization and activity of human monoamine oxidase (MAO) A and B genes. *J. Neurosci.* **12**, 4437–4446 (1992).
55. Protas, M. E. *et al.* Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nat. Genet.* **38**, 107–111 (2006).
56. Bilandzija, H., Ma, L., Parkhurst, A. & Jeffery, W. R. A potential benefit of albinism in *Astyanax* cavefish: downregulation of the *oca2* gene increases tyrosine and catecholamine levels as an alternative to melanin synthesis. *PLoS ONE* **8**, e80823 (2013).
57. Rétaux, S. & Elipot, Y. Feed or fight: a behavioral shift in blind cavefish. *Commun. Integr. Biol.* **6**, e23166 (2013).
58. Strickler, A. G. & Soares, D. Comparative genetics of the central nervous system in epigean and hypogean *Astyanax mexicanus*. *Genetica* **139**, 383–391 (2011).
59. Brunner, H. G., Nelen, M., Breakefield, X. O., Ropers, H. H. & van Oost, B. A. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* **262**, 578–580 (1993).
60. Piton, A. *et al.* 20ans après: a second mutation in MAOA identified by targeted high-throughput sequencing in a family with altered behavior and cognition. *Eur. J. Hum. Genet.* doi: 10.1038/ejhg.2013.243, e-pub ahead of print 30 October 2013 (2013).
61. Bortolato, M. & Shih, J. C. Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. *Int. Rev. Neurobiol.* **100**, 13–42 (2011).
62. Hinaux, H. *et al.* A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachon cavefish. *Zebrafish* **8**, 155–165 (2011).

Acknowledgements

We thank Stéphane Père and Magalie Bouvet for taking care of our *Astyanax* colony, Ernesto Maldonado for help in obtaining the Mexican field work permit, Bill Jeffery for providing Molino fin-clips, the Imagif platform and particularly Yan Jaszczyszyn for Illumina sequencing, FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) for financial support to Y.E., and the Pachón cavefish genome project team and particularly Wes Warren and Suzanne McGough for the release of the preliminary assembly of this genome (the assembly work was supported by National Institutes of Health, NCRR and ORIP, Division of Comparative Medicine grant R24 OD011198 to Wes Warren). Our work is supported by ANR (Agence Nationale pour la Recherche) grants [ASTYCO] and [BLINDETEST] to S.R.

Author contributions

Y.E., J.C. and S.R. performed HPLC and MAO activity studies; J.-M.L. performed enzymatic activity analyses; Y.E., M.B. and S.R. carried out histological and expression

studies; Y.E. and H.H. performed cloning and sequencing experiments; H.H. did the bioinformatics analysis; Y.E. and S.R. designed the experiments and analysed the data; all authors discussed the data; S.R. wrote the paper.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Elipot, Y. *et al.* A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax* cavefish behavioural syndrome. *Nat. Commun.* 5:3647 doi: 10.1038/ncomms4647 (2014).

Uncorrected Proof

Le poisson *Astyanax mexicanus* présente, au sein de la même espèce, plusieurs populations de poissons de rivières (SF) et de poissons de grottes aveugles (CF). Chez les poissons cavernicoles aveugles, les yeux se développent presque normalement pendant l'embryogenèse. Mais 24 heures après la fécondation (hpf), quand l'embryon éclot, le cristallin entre en apoptose, ce qui déclenche la dégénérescence progressive de l'œil entier. Mon projet de thèse visait à comprendre le mécanisme conduisant à l'apoptose du cristallin, jusqu'alors totalement inconnu, en partant du postulat selon lequel le défaut devait avoir lieu pendant les stades précoces du développement du cristallin.

Le cristallin se développe à partir d'une placode, un épaississement de l'ectoderme au stade neurula. Toutes les placodes, qui donnent naissance à des organes des sens de la tête, sont issues du champ panplacodal, situé à la bordure de la plaque neurale antérieure à 10 hpf. Nous avons comparé la régionalisation de ce champ chez les deux morphes, par hybridations *in situ* de gènes marqueurs des différentes placodes. Chez le CF, le territoire présomptif du cristallin est réduit à 10 hpf, et le cristallin est plus petit à tous les stades étudiés. D'autre part, la placode olfactive est étendue, et donne naissance à un épithélium olfactif plus large chez le CF. Les modifications de taille de ces deux placodes pourraient être le résultat évolutif d'un « trade-off » entre ces deux composantes sensorielles. La régionalisation modifiée du champ panplacodal chez le CF est due au moins partiellement à des différences spatiales et temporelles d'expression des molécules de signalisation Shh, Fgf, et peut-être Bmp4.

Nous avons pensé que la petite taille du cristallin pouvait être la cause directe de son entrée en apoptose, par un défaut d'effet de communauté. Nous avons réalisé une ablation laser partielle des cellules précurseurs du cristallin à 12-14 hpf chez l'embryon SF, mimant ainsi la taille du cristallin CF. L'apoptose dans le petit cristallin des larves SF à 60 hpf n'a pas été augmentée, ce qui montre que la petite taille n'est pas suffisante pour induire l'apoptose.

L'apoptose du cristallin pourrait aussi provenir de défauts de morphogenèse ou d'un problème de lignage cellulaire. Nous utilisons donc l'imagerie biphoton *in vivo* sur des embryons SF et CF, de 10 à 24 hpf, préalablement injectés au stade une cellule avec des ARNm de H2B-mCherry et Ras-GFP pour marquer les noyaux et les membranes. Les premiers résultats sur les poissons de surface montrent que nous pouvons suivre à rebours les cellules du cristallin de la fin du film jusqu'au champ panplacodal, et étudier la morphogenèse et les divisions.

La différenciation du cristallin est également affectée chez le CF : au moins 5 cristallines, qui sont des protéines structurales du cristallin, ne sont pas exprimées correctement chez le CF, d'après des hybridations *in situ* et des qPCR. Cependant, le rôle fonctionnel de deux de ces modifications d'expression a été testé, et individuellement, elles n'expliquent pas le phénotype apoptotique. Nous émettons l'hypothèse qu'une combinaison de défauts d'expression de plusieurs cristallines serait à l'origine de l'apoptose du cristallin CF.

Enfin, et plus largement, les forces évolutives qui ont conduit à la perte de l'œil chez *Astyanax mexicanus* ne sont pas encore comprises. Par une étude d'évolution moléculaire à l'échelle du transcriptome, nous avons identifié des mutations fixées entre SF et CF, et avons pu mettre en évidence une accumulation de mutations dans des « gènes d'yeux » chez les CF. Cela suggère un relâchement de la pression de sélection sur ces gènes, peut-être devenus inutiles dans l'obscurité. De même, les séquences des cristallines de CF paraissent accumuler des mutations fixées à un taux élevé vu leur bas niveau de polymorphisme.

